NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

# ARCHIV

FÜR

# XPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

**DR. L. HEILMEYER**
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

**DR. W. HEUBNER**
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

**DR. P. HOLTZ**
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

**DR. L. LENDLE**
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

**226. BAND**
MIT 181 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin • Göttingen • Heidelberg.
Printed in Germany.

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

# Inhalt des 226. Bandes.


Seite

**Albers, C., W. Brendel** und **W. Usinger,** Kreislauf, respiratorischer Stoffwechsel und Atmung in Äthernarkose. Mit 9 Textabbildungen . . . . 278

**Benstz, W.,** Strömungscalorimetrische Untersuchungen zur Beeinflussung der peripheren Wärmeabgabe und des Energieumsatzes durch synthetische Hibernatoren. Mit 1 Textabbildung . . . . . 377

**Börner, W.,** s. **Kimbel, K. H.**

**Brendel, W.,** s. **Albers, C.,** und **W. Usinger.**

**Brüni, Ch.,** s. **Meier, R.,** und **J. Tripod.**

**Clerc, E.,** s. **Langecker, H.**

**Clodi, P. H.,** s. **Pillat, B., O. Kraupp** und **G. Werner.**

**Dau, W.,** s. **Repke, K.,** und **H. Schönitz.**

**Della Bella, D.,** Über ein ganglienlähmendes Sulphoniumderivat: Das Hexamethylen-1,6- bis- Dimethylsulphonium. Mit 5 Textabbildungen . . . . 335

**Dentzer, G.,** Untersuchungen über den Calcium- und den Magnesiumkomplex des äthylendiamintetraessigsauren Natriums. Mit 2 Textabbildungen . 140

**Döring, H. J.,** s. **Gerlach, E.,** und **E. Weber.**

**Dörner, J.,** Zur Frage der Beziehungen zwischen Strophanthintoxicität und Größe der Coronardurchblutung. Mit 3 Textabbildungen . . . . . 152

**v. Eickstedt, K.-W., W.-D. Erdmann** und **K.-P. Schaefer,** Über die blutdrucksteigernde Wirkung von Esteraseblockern (E 605, Eserin und Prostigmin). Mit 1 Textabbildung . . . . . 435

**Enenkel, H. J.,** und **H. W. Pedal,** Vegetatives Nervensystem und Immunität I. 69

**Erdmann, W.-D.,** s. **v. Eickstedt, K.-W.,** und **K.-P. Schaefer.**

**Fazekas, I. Gy.,** Nachweis von Glucocorticoiden in der Muskulatur . . . . 236

**Feller, K.,** Die Wirkung einiger Phenothiazinderivate, insbesondere Megaphen, auf den Gasstoffwechsel der weißen Ratte. Mit 8 Textabbildungen . . . 269

**Filippi, R. G.,** Über schraubenförmige Struktur von Arterien. IV. Mitteilung. Pharmakologische Strukturanalyse von Nabelschnurarterien. Mit 2 Textabbildungen . . . . . 449

**Friebel, H.,** und **C. Reichle,** Zur analgetischen und analgesieverstärkenden Wirkung von Chlorpromazin (Megaphen) . . . . . 551

—, s. **Langecker, H.**

—, s. **Reichle, C.**

**Frowein, R. A., H. Hirsch, D. Kayser** und **W. Krenkel,** Sauerstoffverbrauch, Durchblutung und Vulnerabilität des Warmblütergehirns unter Megaphen (Chloropromazin). Mit 2 Textabbildungen . . . . . 62

**Gerhartz, H., M. Kessel, P. Körtge** und **F. A. Pezold,** Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien. III. Mitteilung. Mit 2 Textabbildungen . . . . 486

**Gerlach, E., E. Weber** und **H. J. Döring,** Einige neue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern. Mit 2 Textabbildungen . . . . . 9

**Giertz, H., F. Hahn** und **W. Rummel,** Über die Bedeutung zentraler Faktoren für die Blutdruckwirkungen von Nicotinsäurediäthylamid (Coramin). Mit 6 Textabbildungen . . . . . 120

—, Über den Einfluß der Ganglienblockade auf die Blutdruckwirkung zentraler Analeptika. Mit 5 Textabbildungen . . . . . 406

**Greeff, K.,** und **E. Westermann,** Untersuchungen über die muskellähmende Wirkung des Strophanthins. Mit 7 Textabbildungen . . . . . 103

**Haas, B.,** s. **Heim, F.**

Seite

**Haas, H.,** und **W. Klavehn,** Über 3-Piperidino-1-phenyl-1-bicycloheptenyl-propanol-(1) (Akineton) . . . . . 18

**Hahn, F.,** und **R. Schunk,** Zur Frage der Avertinwirkung auf die Cardiazol-entgiftung. Mit 1 Textabbildung . . . . . 383

—, —, Untersuchungen über die akute Zinkvergiftung . . . . . 424

—, s. **Giertz, H.,** und **W. Rummel.**

**Haxthausen, E. Frhr. v.,** Über Amino-Pyridin und seine Derivate. Mit 4 Text-abbildungen . . . . . 163

**Hecht, G.,** Über den Mechanismus der Kollidonausscheidung der Niere. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 46

**Heim, F.,** und **B. Haas,** Der Einfluß von Megaphen auf Motilität und Sauer-stoffverbrauch weißer Mäuse in Ruhe und Erregung. Mit 1 Textabbildung 395

**Heller, J.,** s. **Krulich, L.,** und **J. Štěpán.**

**Hille, U.,** s. **Kuschinsky, G.,** und **H. Schimassek.**

**Hirsch, H.,** s. **Frowein, R. A., D. Kayser** und **W. Krenkel.**

**Job, C., O. Schaumann** und **H. Schmidt,** Die Wirkung der Anoxie auf den isolierten Meerschweinchendarm. Mit 6 Textabbildungen . . . . . 130

**Kayser, D.,** s. **Frowein, R. A., H. Hirsch** und **W. Krenkel.**

**Kessel, M.,** s. **Gerhartz, H., P. Körtge** und **F. A. Pezold.**

**Kimbel, K. H.,** und **W. Börner,** Über den Verbleib von $^{131}J$ markiertem Uro-grafin im Körper. Mit 1 Textabbildung . . . . . 263

**Klavehn, W.,** s. **Haas, H.**

**Kobinger, W.,** s. **Kraupp, O., H. Stormann** und **G. Werner.**

—, s. **Kraupp, O., G. Werner** und **H. Stormann.**

**König, A.,** s. **Oeff, K.**

**Körtge, P.,** s. **Gerhartz, H., M. Kessel** und **F. A. Pezold.**

**Koslowski, L., W. Marggraf** und **B. Piper,** Der Einfluß der Milzexstirpation auf posttraumatische Veränderungen der Blutgerinnung und des Blut-bilds bei der Ratte . . . . . 78

**Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger** und **H. Stormann,** Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Acetylcholin. Mit 3 Textabbildungen . . 301

—, **W. Kobinger, H. Stormann** und **G. Werner,** Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skelet-muskulatur durch Acetylcholin. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 403

—, s. **Pillat, B., P. H. Clodi** und **G. Werner.**

**Krause, K.,** und **Dorothee Schmidtke-Ruhnau,** Die sympathicusdämpfende Wirkung des Megaphens. Mit 6 Textabbildungen . . . . . 243

**Krenkel, W.,** s. **Frowein, R. A., H. Hirsch** und **D. Kayser.**

**Kreppel, E.,** s. **Zipf, H. F.**

—, s. **Zipf, H. F.,** und **E. Wetzels.**

**Krulich, L., J. Heller** und **J. Štěpán,** Über die Pharmakologie von Produkten des Cholins mit Nicotinsäure. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 328

**Kuchinke, E.,** s. **Thoma, K.,** und **A. Schöntag.**

**Kuschinsky, G., U. Hille** und **H. Schimassek,** Über Histamin als Mittler-substanz bei der Wirkung von Adrenochrom als Aktivator von Reticulo-endothelzellen. Mit 1 Textabbildung . . . . . 1

**Kuschinsky, G.,** und **H. Schimassek,** Über die Rolle des Histamins bei der Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalin. Mit 2 Textabbildungen 5

Seite

**Kuschke, H. J.,** und **H. Straub,** Über die Gefäßwirksamkeit wasserlöslicher Crataegussäuren . . . . . 547

**Langecker, H.,** und **H. Loppnow,** Die Adsorption von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und Sulfaäthylthiodiazol an Plasmaeiweiß und ihr Einfluß auf Verteilungsvorgänge. V. Mitteilung. Mit 1 Textabbildung. . . . . 36

—, und **E. Clerc,** Die Verteilung von $CNS'$, $S_2O_3$ und $Li^+$ auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Perikardflüssigkeit beim nierenlosen Hund VI. . . . . 417

—, und **H. Friebel,** Die Bedeutung der N-Substitution bei der adrenergischen Übertragung . . . . . 493

**Lembeck, F.,** und **K. Neuhold,** Nachweis von 5-Oxytryptamin im Harn. Mit 1 Textabbildung . . . . . 456

**Loppnow, H.,** s. **Langecker, H.**

**Lüllmann, H.,** s. **Muscholl, E.**

**Marggraf, W.,** s. **Koslowski, L.,** und **B. Piper.**

**Matthies, H.-J.,** Über Stoffwechselleistungen roter Blutkörperchen. IV. Substratverarmung und Stoffwechselaktivität. Mit 4 Textabbildungen . . 442

**Meier, R., J. Tripod** und **Ch. Brüni,** Zur Charakterisierung des Angriffspunktes der Veratrinalkaloide an der glatten Muskulatur. Mit 2 Textabbildungen 319

—, und **E. Tschopp,** Die Abhängigkeit der Größe und Form der Zeit-Wirkungsfläche von Dosis und Resorptionsgröße bei Testosteronestern. Mit 7 Textabbildungen. . . . . 532

**Muscholl, E.,** und **H. Lüllmann,** Die Wirkung von Acetylcholin, Dekamethonium und d-Tubocurarin am isolierten Rattenzwerchfell in Abhängigkeit von der Denervationsdauer. Mit 4 Textabbildungen . . . . 88

**Neuhold, K.,** s. **Lembeck, F.**

**Neun, H.,** s. **Wagner, K.,** und **S. Sailer.**

**Oeff, K.,** und **A. König,** Das Blutvolumen einiger Rattenorgane und ihre Restblutmenge nach Entbluten bzw. Durchspülung. Bestimmung mit $P^{32}$-markierten Erythrocyten . . . . . 98

**Oehler, H.,** s. **Zipf, H. F.**

**Oettel, H.,** und **G. Wilhelm-Kollmannsperger,** Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen. I. Mitteilung. Mit 4 Textabbildungen. . 473

**Pedal, H. W.,** s. **Enenkel, H. J.**

**Peters, K.,** Cytologische und toxikologische Untersuchungen über die Beeinflussung der Colchicinwirkung durch Megaphen. Mit 3 Textabbildungen . . . . . 570

**Pezold, F. A.,** s. **Gerhartz, H., M. Kessel** und **P. Körtge.**

**Pillat, B., P. H. Clodi, O. Kraupp** und **G. Werner,** Die Wirkung von Biscarbaminoylcholinestern auf das Endplattenpotential, untersucht am Musculus gracilis der Katze. Mit 3 Textabbildungen. . . . . 563

**Piper, B.,** s. **Koslowski, L.,** und **W. Marggraf.**

**Reichle, C.,** und **H. Friebel,** Zur Hemmung des Hustenreflexes durch zentral angreifende Arzneimittel . . . . . 558

—, s. **Friebel, H.**

**Repke, K.,** Der Einfluß des Glucose-Dehydrogenasesystems auf Oestron und Oestradiol-17$\beta$ . . . . . 219

—, **W. Dau** und **H. Schönitz,** Der Einfluß des Lichts auf ein wasserstoffübertragendes SH-Ferment der Haut. Mit 1 Textabbildung. . . . . 225

**Roesch, E.,** Über den Antagonismus von N-Allylnormorphin zu Morphin und Eukodal am Kreislauf von wachen Hunden. Mit 7 Textabbildungen 518

**Rummel, W.,** s. **Giertz, H.,** und **F. Hahn.**

Seite

**Sailer, S.,** s. **Wagner, K.,** und **H. Neun.**
**Schaefer, K.-P.,** Wirkung von E 605 und anderen Esteraseblockern auf Körperstell- und -haltereflexe. Mit 1 Textabbildung . . . . . 505
**Schaefer, K.-P.,** s. **v. Eickstedt, K.-W.,** und **W.-D. Erdmann.**
**Schaumann, O.,** s. **Job, C.,** und **H. Schmidt.**
—, s. **Kuschinsky, G.**
**Schimassek, H.,** s. **Kuschinsky, G.,** und **U. Hille.**
**Schmidt, H.,** s. **Job, C.,** und **O. Schaumann.**
**Schmidt, L.,** Vergleichende Pharmakologie und Toxikologie der Laxantien. Mit 5 Textabbildungen . . . . . 207
**Schmidtke-Ruhnau, Dorothee,** s. **Krause, D.**
**Schönitz, H.,** s. **Repke, K.,** und **W. Dau.**
**Schöntag, A.,** s. **Thoma, K.,** und **E. Kuchinke.**
**Schulze, G., D. Winne** und **W. Zurmöhle,** Lipoid-, Eiweiß- und Fermentaktivitätsuntersuchungen im Serum bei experimenteller Nierenschädigung durch Uranylnitrat. Mit 1 Textabbildung . . . . . 114
**Schunk, R.,** s. **Hahn, F.**
**Sommer, S.,** Zum Einfluß von somatotropem Hormon und Cortison auf den Verlauf einer experimentellen Trypanosomeninfektion (Trypanosoma cruzi) . . . . . 527
**Štěpán, J.,** s. **Krulich, L.,** und **J. Heller.**
**Stille, G.,** Die Wirkung von Anticonvulsiva auf das Rückenmark. Mit 6 Textabbildungen . . . . . 172
**Stormann, H.,** s. **Kraupp, O., W. Kobinger** und **G. Werner.**
—, s. **Kraupp, O., G. Werner** und **W. Kobinger.**
**Straub, H.,** s. **Kuschke, H. J.**
**Studer, A.,** s. **Zbinden, G.**
**Taupitz, A.,** Histochemische Untersuchungen an Gewebekulturen über den Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle in Abhängigkeit vom Kaliumgehalt des Nährmediums. Mit 7 Textabbildungen . . . . . 197
**Thoma, K., A. Schöntag** und **E. Kuchinke,** Der mikrochemische Arsennachweis und seine Brauchbarkeit zur Identifizierung von Menstruationsblut. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 255
**Tripod, J.,** s. **Meier, R.,** und **Ch. Brüni.**
**Tschopp, E.,** s. **Meier, R.**
**Usinger, W.,** s. **Albers, C.,** und **W. Brendel.**
**Wagner, K., S. Sailer** und **H. Neun,** Einfluß von Lanthanchlorid auf Erythrocyten und Blutgerinnung. Mit 1 Textabbildung . . . . . 467
**Weber, E.,** s. **Gerlach, E.,** und **H. J. Döring.**
**Werner, G.,** s. **Kraupp, O., W. Kobinger** und **H. Stormann.**
—, s. **Kraupp, O., W. Kobinger** und **H. Stormann.**
—, s. **Pillat, B., P. H. Clodi** und **O. Kraupp.**
**Westermann, E.,** s. **Greeff, K.**
**Wetzels, E.,** s. **Zipf, H. F.,** und **E. Kreppel.**
**Wilhelm-Kollmannsperger, G.,** s. **Oettel, H.**
**Winne, D.,** s. **Schulze, G.,** und **W. Zurmöhle.**
**Zbinden, G.,** und **A. Studer,** Beurteilung der unspezifisch-toxischen Wirkungen von Arzneimitteln aus dem Knochenmark der Ratte. Mit 10 Textabbildungen . . . . . 180
**Zipf, H. F.,** und **E. Kreppel,** Langanhaltende Endoanaesthesie durch Dodecylpolyäthylenoxydäther. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 340
—, — und **E. Wetzels,** Untersuchungen zur Definition einer katelektronischen Form der Endoanaesthesie. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 348
—, und **H. Oehler,** Die Trachealverschlußreaktion nach Head, eine Hilfsmethode zum Nachweis endoanaesthetischer Wirkungen. Mit 9 Textabbildungen . . . . . 363
**Zurmöhle, W.,** s. **Schulze, G.,** und **D. Winne.**

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 1—4 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

# Über Histamin als Mittlersubstanz bei der Wirkung von Adrenochrom als Aktivator von Reticuloendothelzellen.

Von
G. Kuschinsky, Ursula Hille, H. Schimassek.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 28. Februar 1955.)*

Jancsó beschrieb 1947 Histamin als einen physiologischen Aktivator des reticulo-endothelialen Systems (RES). Er konnte zeigen, daß normale Gefäßendothelien unter der Wirkung von Histamin intravenös injizierte Tuschepartikelchen speicherten und daß dieser Effekt durch Antihistaminica zu verhindern war. Auch nach der Freisetzung von Histamin im Gewebe durch entzündungsfördernde Substanzen verwandelten sich die Endothelien in Zellen mit Speicherfunktion. Diese Umwandlung der Zellen zu Speicherzellen und die Verhinderung dieses Effektes durch Antihistaminica kann umgekehrt als Nachweis für die Freisetzung von Histamin durch bestimmte Substanzen verwendet werden. Die Ergebnisse von Jancsó sind von anderen Autoren bestätigt und erweitert worden (Gabrieli; Matoltsy). Obgleich auch Kewitz u. Morgan die obengenannte Histaminwirkung und ihre Aufhebung durch Antistin bestätigten, konnten sie, zum Teil im Gegensatz zu Matoltsy, mit anderen Antihistaminica den Histamineffekt nicht aufheben.

Die Befunde früherer Arbeiten über die Wirkung von Adrenochrom (Kuschinsky, Hille, Emmerich; Kuschinsky, Hille, Schimassek) berechtigten zu der Annahme, daß das Oxydationsprodukt des Adrenalins, Adrenochrom, Histamin im Organismus freisetzt. Die folgenden Versuche — unter ganz anderen Bedingungen und am anderen Objekt durchgeführt — zeigen wiederum, daß unter der Wirkung von Adrenochrom Histamin freigesetzt wird.

## Methodik.

Männlichen und weiblichen Ratten von etwa 200 g Körpergewicht (insgesamt 34 Tieren) wurde die Bauchhaut mit der Schere enthaart. Im Ätherrausch injizierten wir den Tieren intracutan die zu testenden Substanzen, die in 0,025 oder 0,05 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst waren. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung intracutan injiziert; Kontroll- und Testlösungen wurden stets nebeneinander an jedem Tier verglichen. Jede Ratte erhielt rechts und links der Medianlinie je 2—3 Quaddeln. Unmittelbar darauf erfolgte die Injektion von 1 ml Perltusche in die Schwanzvene. Nach etwa 2 Std wurden die Tiere getötet. Wenn Tuschespeicherung eintritt, dann ist dies zu diesem

Zeitpunkt auf der Innenseite der freipräparierten Bauchhaut im Bereich der gesetzten Quaddeln sichtbar. In einigen Fällen haben wir die schwarzgefärbten Hautstellen herausgeschnitten und in Formol fixiert. Nach Paraffineinbettung wurden die Präparate histologisch aufgearbeitet und die Schnitte nach van Gieson gefärbt.

Verwendete Substanzen: Perltusche (G. Wagner) wurde 1:5 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Um größere Partikel aus der Suspension zu entfernen, haben wir die verdünnte Tusche 4mal durch ungehärtete Filter filtriert und das letzte Filtrat 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Histaminhydrochlorid[1] und

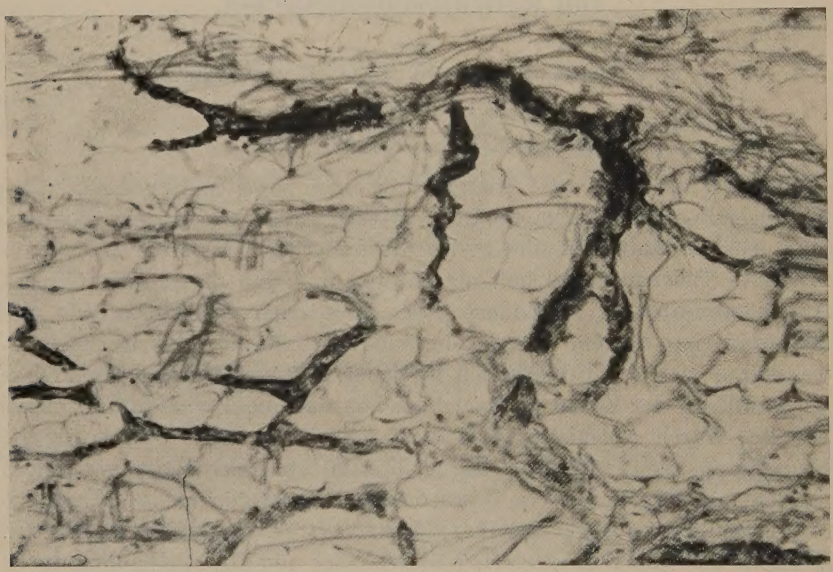


Abb. 1. Tuschefixierung an den Endothelien kleiner Gefäße nach intracutaner Injektion von 50 $\gamma$ Adrenodrom in der Bauchhaut von Ratten. Formolfixierung. Färbung nach van Gieson. Vergröß. etwa 350fach.

Adrenochrom[1] sind kurz vor den Versuchen in physiologischer NaCl-Lösung gelöst worden. Als Antihistaminicum verwendeten wir Luvistin[1] (Pyrrolidyl-äthylphenylbenzylamin-HCl), das wir 30 min vor den Testlösungen (5 mg/100 g Körpergewicht i. p.) injizierten.

## Ergebnisse.

Nach 25—50 $\gamma$ Histamin resultierte in der Umgebung der Injektionsstelle eine deutliche Schwarzfärbung der Haut. Im Vergleich dazu war im Bereich der Kontrollquaddeln nur an der Einstichstelle der Kanüle eine geringe Tuscheablagerung zu erkennen. Im histologischen Bild ist nach Histamin eine Anlagerung von Tuschepartikeln entlang der Endothelien der kleinen und kleinsten Gefäße zu beobachten.

Nach intracutaner Injektion von destilliertem Wasser oder nach Quetschung der Haut mit einer Darmklemme trat ebenfalls Tusche-

[1] Für die verwendeten Substanzen danken wir den Firmen Deutsche Hoffmann-La Roche, Grenzach, Labaz, Brüssel, und C. F. Boehringer Söhne, Mannheim.

speicherung im Bereich des verletzten Gewebes ein, jedoch in deutlich geringerem Maße als nach der Histamininjektion.

Durch Vorbehandlung der Tiere mit 5 mg/kg Luvistin intraperitoneal ließ sich die Tuschefixierung an den Endothelien stark abschwächen bzw. verhindern.

Praktisch das gleiche Bild wie nach der Histaminbehandlung ergab sich nach der intracutanen Injektion von 50 $\gamma$ Adrenochrom. Die Schwarzfärbung der Haut erschien nicht ganz so stark wie nach den Histamininjektionen. Im histologischen Bild fand sich aber in gleicher Weise wie nach Histamin eine Tuschefixierung an den Gefäßendothelien (Abb. 1). Durch Vorbehandlung der Tiere mit 5 mg/kg Luvistin intraperitoneal wurde auch die Tuschebindung nach Adrenochrom verhindert.

## Besprechung der Ergebnisse.

Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß Adrenochrom unter biologischen Bedingungen im Gewebe Histamin freisetzt. Das freigesetzte Histamin bewirkt die Umwandlung der Gefäßendothelien zu Speicherzellen. Damit wird wiederum der wesentliche Einfluß des Histamins — und indirekt auch der des Adrenochroms — auf das RES deutlich.

Wie die eingehenden Untersuchungen von Matoltsy u. Matoltsy zeigen, handelt es sich im Zeitraum bis zu 60 min nach der Injektion von Histamin um eine Anlagerung der Tuschepartikel an der Oberfläche der Endothelien. Nach 6 Std sind die Tuscheteilchen bereits in den Zellen nachweisbar und nach 24—48 Std finden sich auch in den umliegenden Fibrocyten und Histiocyten Tuschepartikel.

In Anlehnung an diese genauen Studien ist in den hier beschriebenen Versuchen nur das erste Stadium der Tuschespeicherung nach Matoltsy beschrieben worden.

Es sei ferner an die Befunde von Halpern u. Mitarb. und Petri u. Mitarb. erinnert, die zeigen konnten, daß die Ausbreitung einer lokal gesetzten Infektion durch Histamin verhindert wird. Nach Vorbehandlung der Tiere mit Antihistaminica breiteten sich die Keime rasch aus; es kam zu Zeichen der Generalisation der Infektion und zum Tod der Tiere. Das Auftreten von Histamin bei Entzündungen oder Verletzungen ist demnach für die Abwehrfunktion des Körpers sehr entscheidend.

In neueren Versuchen zeigten Janscó u. Janscó-Gabor, daß Histiocyten nach der Einwirkung von Histamin sowohl artfremdes als auch arteigenes Bluteiweiß speichern. In dieser Arbeit wird von Janscó — als Erweiterung der physiologischen Bedeutung des Histamins — auf die wesentliche Funktion des RES als speicherndes und verarbeitendes Organ von Plasmaproteinen hingewiesen. Eine Reihe von weiteren Autoren (Halpern, Dumas, Reber; Halpern, Benacerrat, Péan,

Salva; Petri, Csipak, Kovacs, Bentzik) haben mit Hilfe von Antihistaminica gezeigt, welche Bedeutung das Histamin für die Lokalisierung bakterieller Infektionen hat. — Die zum Teil im Gegensatz zu so vielen Befunden über die Wirkung von Antihistaminica auf die Speicherung im RES stehenden Ergebnisse von Kewitz u. Morgan mögen vielleicht auf methodischen Unterschieden beruhen.

Vorläufig läßt sich nicht entscheiden, ob Adenochrom unter physiologischen bzw. pathologischen Bedingungen den hier geschilderten Einfluß auf Gefäßendothelien ausübt. Ebenso bleibt die Frage, auf welche Weise es nach Adrenochrom zur Histaminfreisetzung kommt — wie bei allen anderen Histaminfreisetzern — ungeklärt.

## Zusammenfassung.

In Bestätigung der Befunde von Jancsó zeigt sich, daß nach intracutaner Injektion von 25—50 $\gamma$ Histamin in die Bauchhaut von Ratten eine Aktivierung des Gefäßendothels eintritt. Intravenös injizierte Tusche wird von den Gefäßendothelien an der Injektionsstelle des Histamins gespeichert.

50 $\gamma$ Adrenochrom intracutan haben den gleichen Effekt wie Histamin.

Das Antihistaminicum Luvistin verhindert die obengenannten Wirkungen von Histamin und Adrenochrom.

## Literatur.

Gabrieli, E. R.: Effect of antihistamine on the reticuloendothelial system; Investigation of reticuloendothelial function with the aid of radioactive chromium-phosphate. Nature (Lond.) **168**, 467 (1951). — Halpern, B. N., J. Dumas et H. Reber: Rôle favorisant d'un antihistaminique de synthèse dans la généralisation de l'infection locale. C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 1563 (1949). — Halpern, B. N., B. Benacerraf, V. Péan, et J. A. Salva: Infections spontanées graves chez le cobaye après administration répété d'un antihistaminique de synthèse. C. r. Soc. Biol. (Paris) **144**, 667 (1950). — Jancsó, M.: Histamine as a physiological activator of the reticuloendothelial system. Nature (Lond.) **160**, 227 (1947). — Jancsó, N., u. A. Jancsó-Gabor: Die Speicherung von Blutproteinen in den Histiocyten nach vorhergehender Histaminwirkung. Experientia (Basel) **10**, 256 (1954). — Kewitz, H., u. K. Morgan: Über die Bedeutung des Histamins für die Phagocytose von Tuschepartikelchen durch Endothelien. Arch exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 399 (1954). — Kuschinsky, G., U. Hille u. R. Emmerich: Über die Wirkung von Adrenochrom an isolierten Organen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 39 (1952). — Kuschinsky, G., U. Hille u. H. Schimassek: Über Histamin als Mittler-Substanz bei der Wirkung von Adrenochrom auf die Blutungszeit. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 48 (1952). — Matoltsy, A. G., and M. Matoltsy: The action of histamine and antihistaminic substances on the endothelial cells of the small capillaries in the skin. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 237 (1951). — Petri, G., J. Csipak, A. Kovacs u. M. Bentzik: Neuere Beiträge zur Pathologie der pyogenen Entzündung. I. Die Rolle des Histamins bei der pyogenen Entzündung bzw. die Wirkung synthetischer Antihistaminica auf deren Verlauf. Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 32 (1952).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakol. Institut d. Univ. Mainz.
Dr. H. Schimassek, Marburg/Lahn, Fontanestr. 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 5—8 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

# Über die Rolle des Histamins bei der Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalin.

Von
G. Kuschinsky und H. Schimassek.

Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 28. Februar 1955.)*

Adrenalin, eine Reihe anderer Sympathomimetica und Adrenochrom verkürzen die Blutungszeit, wie Derouaux in Versuchen an Kaninchen nachgewiesen hat. — In einer früheren Mitteilung (Kuschinsky, Hille u. Schimassek) konnte gezeigt werden, daß die Wirkung von Adrenochrom auf die Blutungszeit durch die Vermittlung von Histamin zu erklären ist. Denn die Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenochrom ließ sich sowohl durch Antihistaminica aufheben als auch durch Vorbehandlung mit Antihistaminica verhindern.

Wir haben untersucht, ob auch Adrenalin über die Vermittlung von Histamin die Blutungszeit beeinflußt, zumal mehrere Autoren die Freisetzung von Histamin nach Adrenalin festgestellt haben (Eichler u. Barfuss; Staub; Malméjac u. Mitarb.; C. W. M. Wilson).

## Methodik.

Die Versuche sind wiederum an (insgesamt 34) Kaninchen nach der etwas veränderten Methode von Roskam u. Derouaux unternommen worden (Kuschinsky, Hille u. Schimassek). Die etwa 1,5 kg schweren Tiere erhielten eine intravenöse Injektion von 10 $\gamma$ l-Adrenalin (in physiol. NaCl-Lösung). In bestimmten Zeitabständen (vgl. Abb. 1) erfolgte dann die Testung der Blutungszeit. Der Einfluß der Antihistaminica wurde in zwei Versuchsreihen geprüft: In der einen Versuchsanordnung erhielten die Tiere auf der Höhe der Adrenalinwirkung die intravenöse Injektion eines Antihistaminicums; im anderen Falle wurden die Kaninchen 20 min vor der Adrenalininjektion mit Casantin (N-Diäthylaminoäthylphenothiazinsalz) oder Luvistin (Pyrrolidyl-äthylphenyl-benzylaminsalz) vorbehandelt. Die intravenös gegebene Dosis betrug für beide Antihistaminica 15 mg (in 0,9%iger NaCl-Lösung). Die Ergebnisse wurden nach dem t-Test statistisch ausgewertet (Snedecor)*.

## Ergebnisse.

10 min nach der intravenösen Injektion von 10 $\gamma$ Adrenalin war die Blutungszeit im Durchschnitt von 83 sec auf 45 sec, also um etwa 50%

* Wir danken folgenden Firmen für die freundliche Überlassung von Substanzen: Farbwerke Hoechst für Suprarenin, Cassella Farbwerke Frankfurt für Casantin, C. F. Boehringer Mannheim für Luvistin.

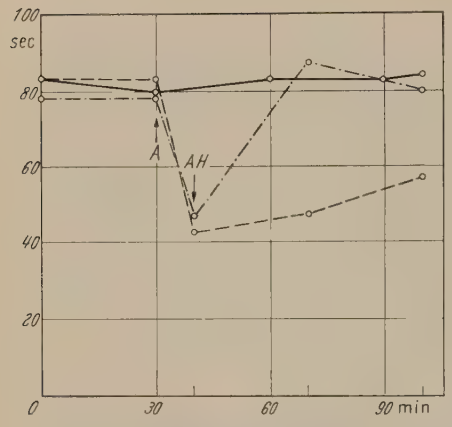



Abb. 1. Beeinflussung der Blutungszeit an Kaninchen durch Adrenalin und Antihistaminica. Abszisse: Dauer des Versuches (Zeit in Minuten). Ordinate: Blutungszeit (Zeit in Sekunden). Kontrolle: ———; Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalininjektion (*A* 10 $\gamma$ i.v.): — — —; Aufhebung der Adrenalinwirkung durch Antihistaminica (*AH* 15 mg Casantin oder Luvistin i. v.): — · — · — · (Mittelwerte aus Versuchen an jeweils 7—12 Tieren).

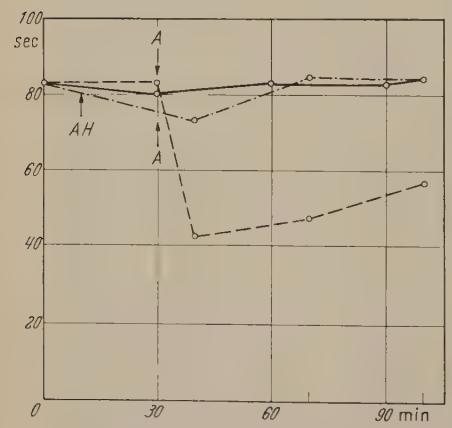



Abb. 2. Beeinflussung der Blutungszeit durch Adrenalin und Antihistaminica an Kaninchen. Abszisse: Dauer des Versuches (Zeit in Minuten). Ordinate: Blutungszeit (Zeit in Sekunden). Kontrolle: ———; Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalininjektion (*A* 10 $\gamma$ i.v.): — — —; Aufhebung der Adrenalinwirkung durch Vorbehandlung mit Antihistaminica (*AH* 15 mg Casantin oder Luvistin, 20 min vor der Adrenalininj. i.v.): — · — · — · (Mittelwerte aus Versuchen an jeweils 7—12 Tieren).

verkürzt. Danach stiegen die Werte wieder langsam an, lagen aber noch nach 70 min mit 57 sec um fast 30% unter den Blutungszeiten der Kontrolltiere.

Wurden auf der Höhe der Adrenalinwirkung (nach 10 min) 15 mg der Antihistaminica Casantin oder Luvistin intravenös injiziert, so stieg die Blutungszeit rasch wieder an. Der 40 min-Wert lag dann bereits im Bereich der Kontrollen. Eine Verlängerung der Blutungszeit durch die verwendeten Antihistaminica trat bei dieser Dosierung nicht ein (Abb. 1).

Durch Vorbehandlung der Kaninchen mit den genannten Antihistaminica (15 mg intravenös, 20 min vor der Adrenalininjektion) wurde die Adrenalinwirkung auf die Blutungszeit unterdrückt (Abb. 2). Die entsprechende Kurve in Abb. 2 zeigt zwar eine geringe Verkürzung der Blutungszeit; die Differenzen der Werte zu denen der Kontrollen sind aber statistisch nicht gesichert (Tab. 1).

## Besprechung der Ergebnisse.

Da Adrenalin im Organismus sehr rasch zerstört wird, ist eine direkte Beeinflussung der Blutungszeit durch diese Substanz selbst über die gesamte Versuchsdauer hin nicht wahrscheinlich. Derouaux nimmt an, daß ein stabiles Abbauprodukt des Adrenalins die blutstillende Wirkung entfaltet. Ein Anhaltspunkt für ein Eingreifen dieser Substanzen selbst in den Mechanismus der Blutstillung ist auf Grund der bisherigen

Kenntnisse nicht gegeben. Daß rein mechanische Vorgänge (z. B. Gefäßkonstriktion) bei der Blutstillung über relativ lange Zeit als Effekte von Adrenalin oder Adrenochrom verantwortlich sein sollen, ist ebenfalls wegen der raschen Zerstörung dieser Substanzen unwahrscheinlich.

Demgegenüber stehen die Befunde, daß Adrenalin im Organismus Histamin freisetzt. Ferner zeigt die vorliegende Arbeit, daß die Wirkungen des Adrenalins auf die Blutungszeit durch Antihistaminica sowohl

Tabelle 1. *Statistische Auswertung.*

| | |
|---|---|
| Kontrollen gegenüber Adrenalinwerten | Differenz gesichert ($p < 0{,}001$) |
| Kontrollen gegenüber Antihistaminwerten . . . . . | Differenz nicht gesichert ($p > 0{,}1 \text{ —} > 0{,}5$) |
| Adrenalinwerte nach Antihistaminbehandlung gegenüber den Adrenalinwerten ohne Antihistaminica. . . . | Differenz gesichert ($p < 0{,}001$) |
| Adrenalinwerte nach Antihistaminbehandlung gegenüber Kontrollen . . | Differenz nicht gesichert ($p > 0{,}1 \text{ —} > 0{,}5$) |

aufzuheben als auch zu verhindern sind. Vom Histamin ist weiterhin bekannt, daß es sowohl die Blutungszeit (Kuschinsky, Hille u. Schimassek, Osterrieth u. Lecomte) als auch die Gerinnungszeit (in vivo und in vitro; Zetler) verkürzt. Es ist ferner nachgewiesen, daß Histamin die Inaktivierung des Thrombins durch Heparin antagonistisch beeinflußt (Gerendas, Csefko u. Udvardy).

Die geschilderten Versuche weisen direkt am *biologischen* Objekt nach, daß Histamin bei der Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalin eine wichtige Rolle spielt.

## Zusammenfassung.

Die Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalin konnte durch die Antihistaminica Casantin oder Luvistin sowohl aufgehoben als auch verhindert werden. Die Versuche sprechen dafür, daß Histamin an der Verkürzung der Blutungszeit nach Adrenalin wesentlich beteiligt ist.

## Literatur.

Derouaux, G.: Les médications hémostatiques. Uit de verhandelingen van de Koninglijke Vlaamsche Academie voor Geneeskunde van België 1942, IV Nr. 4. — Eichler, O., u. F. Barfuss: Untersuchungen über den Histamingehalt des Blutes bei Infusion von Adrenalin und Histamin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 82 (1936). — Gerendas, M., I. Csefko and F. Udvardy: Histamine-Heparin-Thrombin chain mechanism. Nature (Lond.) **162**, 257 (1948). — Kuschinsky, G., U. Hille u. H. Schimassek: Über Histamin als Mittlersubstanz bei der Wirkung

von Adrenochrom auf die Blutungszeit. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 48 (1952) (mit weiteren Lit.-Hinweisen). — Malméjac, J., A. Gross et G. Neverre: Histamine et adrenalinosecretion. C. r. Soc. Biol. (Paris) **145**, 704 (1951). — Osterrieth, P. et J. Lecomte: Histamine et le temps de saignement moyen chez le lapin. Arch. internat. Physiol. **66**, 31 (1953). — Snedecor, G. W.: Statistical methods. Ames, Jowa: The Jowa State College Press. 1950. — Staub, H.: Histaminämie nach Adrenalin. Experientia (Basel) **2**, 29 (1946). — Wilson, C. W. N.: Factors influencing the urinary excretion of histamine in the rat. J. of. Physiol. **126**, 141 (1954). — Zetler, G.: Über die beschleunigende Wirkung des Histamins auf die Blutgerinnung und ihre Beeinflussung durch Antihistaminica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 18 (1951).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Mainz, Pharmakol. Institut d. Univ.
Dr. H. Schimassek, Marburg/Lahn, Fontanestr. 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 9—17 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

# Einige neue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern.

Von

Eckehart Gerlach, Ellen Weber und Hans Joachim Döring.

Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 5. April 1955.)*

Zur weiteren Aufklärung des Stoffwechsels von Nucleotiden und Phosphorsäure-Verbindungen wurden in den letzten Jahren von zahlreichen Untersuchern chromatographische Verfahren erfolgreich angewendet. Dabei hat sich für die getrennte Erfassung der in Gewebsextrakten vorkommenden P-Ester die papierchromatographische Arbeitsweise wegen ihrer außerordentlichen Genauigkeit, der nahezu verlustlosen Wiedererfassung kleinster Substanzmengen und wegen ihrer einfachen Handhabung besonders bewährt.

Mit den von Hanes u. Isherwood, Eggleston u. Hems, Zetterström u. Ljunggreen und vielen anderen eingeführten Lösungsmitteln gelingt es auch nach Untersuchungen von Fleckenstein u. Mitarb. die im trichloressigsauren Extrakt vom M. rectus des Frosches, von Säugetier- und Vogel-Erythrocyten vorkommenden P-Verbindungen direkt papierchromatographisch aufzutrennen, ohne daß irgendeine chemische Vorbehandlung des Extraktes notwendig ist. Bei der Aufarbeitung von Organen, wie Leber, Niere, Uterus u. a. treten aber bei der Trennung mit bisher bekannten Lösungsmitteln Schwierigkeiten auf:

1. Da die Konzentration der P-Ester in diesen Geweben geringer ist, kommt es bei der für ihren Nachweis erforderlichen Anreicherung des Gewebsextraktes auf dem Papier auch zu einer stärkeren Konzentrierung von Ionen, wodurch die papierchromatographischen Trennungsergebnisse beeinträchtigt werden;

2. wegen des Vorkommens sehr vieler P-Verbindungen in solchen Organen wird häufig die Abtrennung einzelner Ester durch Ähnlichkeit oder Übereinstimmung in den $R_f$-Werten ungenügend.

Um sich den jeweiligen Gegebenheiten verschiedener Gewebsextrakte bei ihrer papierchromatographischen Aufarbeitung soweit wie irgendmöglich anpassen zu können, braucht man eine größere Zahl von Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Eigenschaften. Daher wurden einige neue Lösungsmittel erprobt, die ein störungsfreies Arbeiten mit den meisten Gewebsextrakten ermöglichen und eine Trennung auch von chemisch sehr ähnlichen Verbindungen bewirken.

**Zusammensetzung und Eigenschaften der neuen Lösungsmittel.**

Von über 200 untersuchten Lösungsmittelgemischen[1] erwiesen sich die folgend beschriebenen für die gleichzeitige Auftrennung von zahlreichen P-Verbindungen auch aus Ionen-reichen Gewebsextrakten als besonders geeignet. Jedes dieser Lösungsmittel kann sowohl „auf- und absteigend" als auch zweidimensional in beliebiger Aufeinanderfolge angewendet werden, wobei die Schärfe der Lokalisation bei jeder der Anwendungsweisen gewahrt bleibt. Eine gesättigte Dampfatmosphäre in den Chromatogrammgefäßen ist während der Laufzeit der Chromatogramme nicht erforderlich.

*Lösungsmittel I.*

30 ml Diisopropyläther
30 ml n-Butanol
20 ml Ameisensäure (98—100%).

Da dieses Lösungsmittel durch Veresterung rasch altert und in solchem Zustand nur ungenügende Trennungen bewirkt, soll es jeweils frisch zubereitet werden. In absteigender Arbeitsweise (etwa 20 Std) bei 18—20° C ist es besonders geeignet für die Auftrennung von Triosephosphaten sowie zur Abtrennung des Orthophosphates und einiger anderer P-Ester von den Nucleotiden.

In der $R_f$-Wert-Tabelle werden die mit diesem Lösungsmittel bestimmten „$R_{Orthophosphat}$"-Werte (auf Orthophosphat als die am weitesten wandernde Substanz im Durchlaufchromatogramm bezogen) aufgeführt.

*Lösungsmittel II.*

45 ml Methyl-äthylketon oder Diisopropyläther
25 ml wassergesättigtes n-Butanol
5 ml n-Propanol
20 ml Ameisensäure (98—100%).

Auch dieses Lösungsmittel muß jeweils frisch angesetzt werden. In aufsteigender Arbeitsweise (etwa 16—20 Std) bei 18—20° C ermöglicht es die Abtrennung fast aller Nucleotide — diese verbleiben in unmittelbarer Nähe der Startlinie — von Nucleosiden, freien Purin- und Pyrimidinkörpern sowie von Orthophosphat und den meisten Triosephosphaten.

*Lösungsmittel III.*

40 ml n-Butanol
20 ml n-Propanol
25 ml Aceton
25 ml 80%ige Ameisensäure
15 ml 30%ige Trichloressigsäure.

[1] Pyridin, Phenol, Harnstoff und verwandte Substanzen wurden als Lösungsmittelbestandteile nicht verwendet, da wegen der geringen Flüchtigkeit solcher Verbindungen ihre eigene Absorption bei 260 m$\mu$ die Lokalisation von Nucleotiden (Photoprint-Verfahren nach Markham u. Smith) erschweren kann.

Die schnell eintretende Veresterung der Bestandteile dieses Lösungsmittels beeinträchtigt seine Trennfähigkeit nicht, sondern bewirkt eine

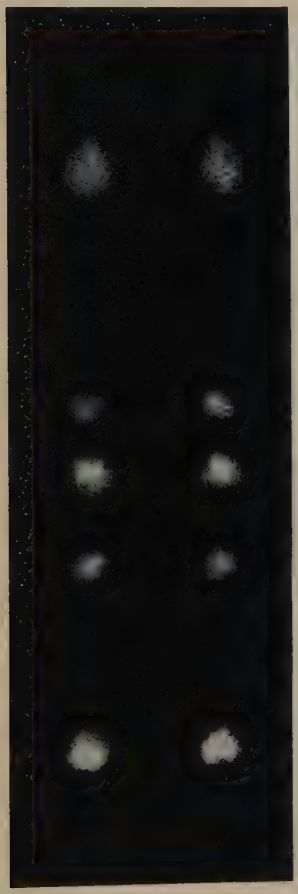



Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 1. UV-Photographie der mit Lösungsmittel III („aufsteigend" 2mal nacheinander je 18 Std bei 18—20° C) getrennten Nucleotide DPN, IMP, UMP, 5-′AMP und des Adenosins. Sehr scharfe Lokalisation der genannten Verbindungen. Der Pfeil zeigt die Laufrichtung des Lösungsmittels an.

Abb. 2. UV-Photographie der mit Lösungsmittel V („absteigend" 2mal nacheinander 36 und 20 Std bei 26° C) aufgetrennten Adenosin-Phosphorverbindungen (5′-ATP, 5′-ADP, 5′-AMP und 3′-AMP). Unterhalb von ATP lokalisiert sich eine schwach UV-absorbierende Substanz, die sich in fast allen Handelspräparaten von ATP findet (vermutliches Adenosin-tetraphosphat). Der Pfeil gibt wiederum die Laufrichtung des Lösungsmittels an.

sehr scharfe Lokalisation von einigen Zucker-P-Estern und Monophosphonucleotiden in den Chromatogrammen (vgl. Abb. 1). Auch für einen der Arbeitsgänge zweidimensionaler Chromatographie eignet sich das

mehrere Wochen verwendbare Lösungsmittel III in aufsteigender Anordnung (ein- oder zweimal nacheinander je 18 Std) bei 18—20° C besonders gut.

Wird bei zweidimensionalen Verfahren zuerst mit Lösungsmittel III chromatographiert, so empfiehlt sich vor der Anwendung eines ammoniakalischen Lösungsmittels für den zweiten Trennungsgang die Entfernung der im Papier verbliebenen Trichloressigsäure mit Diäthyläther anhydr. (mehrmaliges Durchziehen der Chromatogrammbogen durch ein mit Äther gefülltes Schiffchen); auftretende Neutralisationswärme könnte sonst zu einer partiellen Spaltung labiler P-Bindungen führen.

Im Gegensatz zu vielen anderen Lösungsmitteln können die meisten P-Verbindungen mit Lösungsmittel III als Erdalkalisalze chromatographiert werden.

| *Lösungsmittel IV.* | *Lösungsmittel V.* | *Lösungsmittel VI.* |
|---|---|---|
| 35 ml n-Butanol | 35 ml n-Butanol | 30 ml n-Butanol |
| 15 ml n-Propanol | 25 ml n-Propanol | 25 ml n-Propanol |
| 15 ml Aceton | 35 ml Ammoniak (25%ig) | 5 ml Äthanol |
| 40 ml Ammoniak (25%ig) | 10 ml Wasser | 30 ml Ammoniak (25%ig) |
| 5 ml Wasser | | 10 ml Wasser |

In absteigender Arbeitsweise (zweckmäßig einmal 30—36 Std und nochmals 20—24 Std) eignen sich diese Lösungsmittel besonders gut für die Auftrennung der meisten Nucleotide und nahe verwandter Zucker-P-Ester. Die Trennung verschiedener Adenosin-Phosphorsäuren (3′- und 5′-AMP, 5′-ADP und 5′-ATP sowie ein vermutliches Adenosintetraphosphat[1], das in ATP-Handelspräparaten vorkommt) ist in einem Arbeitsgang möglich (vgl. Abb. 2); ebenso lassen sich z. B. ITP und IDP, verschiedene andere Nucleotide[2], Orthophosphat und Kreatinphosphat sowie Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat voneinander abtrennen. Die Arbeitstemperatur für Lösungsmittel IV liegt zwischen 18 und 20° C, die für Lösungsmittel V und VI bei 26° C.

Da die $R_f$-Werte aller getesteten P-Verbindungen für die drei Lösungsmittel in der gleichen Größenordnung liegen, werden in der $R_f$-Wert-Tabelle nur die mit Lösungsmittel V bestimmten „$R_{3'\text{—AMP}}$"-Werte mitgeteilt.

Eine wesentlich verbesserte Trennung der Nucleotide aus Gewebsextrakten mit den aufgeführten ammoniakalischen Lösungsmitteln wird erreicht, wenn 15—18 mg 8-Oxychinolin (Oxim)/100 ml Lösungsmittel direkt dem Lösungsmittel für die erste Anwendung zugesetzt werden. Durch eine nochmalige Chromatographie mit dem gleichen

[1] Der Adenin-Anteil dieser Verbindung wurde als solcher durch eine für alle Adenin-haltigen Verbindungen streng spezifische Farbraktion (Gerlach u. Döring) direkt im Chromatogramm nachgewiesen.

[2] DPN, Cocarboxylase und Flavin-Adenin-Nucleotide eignen sich für die Chromatographie mit ammoniakalischen Lösungsmitteln nicht so gut; diese Verbindungen werden zweckmäßig mit sauren, neutralen oder gepufferten Lösungsmitteln getrennt.

Lösungsmittel, jedoch ohne den genannten Zusatz, wird das Papier von zurückgebliebenem Oxychinolin gereinigt, so daß die Lokalisation von UV-absorbierenden Verbindungen nach dem Photoprint-Verfahren keine Schwierigkeiten bereitet. Die $R_f$-Werte der mit Oxychinolin-haltigen und -freien Lösungsmitteln chromatographierten Substanzen sind identisch.

Die Wirkung des 8-Oxychinolin beruht auf der Bindung von im Papier trotz spezieller Vorbehandlung noch vorhandenen und den mit dem Gewebsextrakt zugeführten Schwermetall- und Erdalkalimetall-Ionen zu alkohol-, d. h. Lösungsmittel-löslichen Komplexsalzen, die meist dicht hinter der Lösungsmittel-Front als sichtbare grünlich-schwarze Bande aus dem Papier herauslaufen. Da die Affinität von Oxychinolin im alkalischen Bereich größer als die der meisten Nucleotide zu diesen Ionen ist, werden während des Chromatographievorganges mit ammoniakalischen, Oxychinolin-haltigen Lösungsmitteln u. a. auch die Nucleotide in ihre Ammonium- bzw. Alkalisalze umgewandelt; diese trennen sich aber ihrer größeren Löslichkeit in der alkoholischen Phase wegen leichter voneinander als die entsprechenden schwerer löslichen Erdalkali- oder gar Schwermetallsalze.

Phosphor-Verbindungen, die noch stabilere Salze als Oxychinolin mit Erdalkalien, besonders Ca und Mg, bilden — hierher gehört z. B. Phytinsäure —, können mit ammoniakalischen Lösungsmitteln nur in Abwesenheit solcher Ionen scharf lokalisiert werden. Zusätzliches gründliches Waschen mit 25%iger Ameisensäure vor der Vorbehandlung mit Dinatriumdihydrogen-aethylendiamintetraacetat (Titriplex III; Idranal III) reinigt die Papiere von den genannten Ionen vollständig. Werden mit dem Gewebsextrakt neuerlich solche Ionen auf das Papier gebracht, so muß das Lösungsmittel einen stärker als Oxychinolin wirkenden Komplexbildner enthalten. Hierfür eignet sich u. a. Dinatriumdihydrogen-aethylendiamintetraacetat (0,2 ml der 1/10 Mol wäßrigen Lösung/100 ml Lösungsmittel, Eggleston u. Hems); jedoch führt nach eigenen Erfahrungen der alleinige Zusatz dieser Substanz zu ammoniakalischen Lösungsmitteln wegen der geringen Alkohollöslichkeit der gebildeten Komplexsalze zum Auftreten störender UV-absorbierender Banden. Mit Sicherheit kann diese Störung vermieden werden, wenn außer dem Natriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure auch noch 8-Oxychinolin (15—18 mg/100,0 ml Lösungsmittel) den Lösungsmitteln zugesetzt wird.

*$R_f$-Werte verschiedener Phosphorsäure-Ester.* Bei der Bestimmung von $R_f$-Werten reiner Testsubstanzen[1] mit den beschriebenen Lösungsmitteln wurde nach folgenden methodischen Punkten verfahren:

1. Papiersorte: Whatman No 1, 20 × 55 cm.

2. Vorbehandlung zur Entfernung von Phosphor und störenden Metall-Ionen aus den Papieren: 45 min Einlegen in eine 0,5%ige wäßrige Lösung von Dinatriumdihydrogen-aethylendiamintetraacetat ($p_H$ 8,5) und anschließend gründliches Auswaschen mit reichlich Aqua dest. (Eggleston u. Hems); gegebenenfalls zusätzliche Vorwaschung mit 25%iger Ameisensäure.

3. Von den 0,5%igen wäßrigen Lösungen aller in die Na- bzw. Ammonium-Salze umgewandelten Testsubstanzen wurden jeweils 2—5 $\mu$l an den Startpunkten aufgetragen.

---

[1] Ein Verzeichnis der verwendeten Testsubstanzen findet sich am Schluß der Arbeit.

4. Lokalisation von Nucleotiden in den Chromatogrammen nach dem Photoprint-Verfahren (Markham u. Smith).

5. Entwicklung der Chromatogramme zur Sichtbarmachung aller P-haltigen Areale durch Besprayen mit Hanes u. Isherwood-Molybdat-Reagens, 7 min Erhitzen auf 85° C und anschließender UV-Bestrahlung mit einer Quarz-Analysenlampe (Bandurski u. Axelrod).

Tabelle 1. *$R_f$-Werte.*

| | Lösungsmittel I<br>2mal nacheinander je 16—18 Std „absteigend" bei 20° C „$R_{Orthophosphat}$" | Lösungsmittel II<br>1mal 18 Std „aufsteigend" bei 20° C „$R_f$" | Lösungsmittel III<br>2mal nacheinander je 18 Std „aufsteigend" bei 20° C „$R_f$" | Lösungsmittel V<br>2mal nacheinander 36 u. 20 Std „absteigend" bei 26° C „$R_{3'-AMP}$" |
|---|---|---|---|---|
| Orthophosphat | 1,00 | 0,35 | 0,62 | 0,73 |
| Pyrophosphat | 0,18 | 0,09 | 0,36 | 0,47 |
| Kreatinphosphat[1] | 0,96 | 0,28 | 0,59 | 0,93 |
| Acetylphosphat | — | — | — | 0,51 |
| Phosphoenolbrenztraubensäure | 0,76 | 0,30 | 0,63 | 0,77 |
| α-Glycerophosphat | 0,52 | 0,23 | 0,53 | 0,98 |
| 2-Phosphoglycerinsäure | 0,40 | 0,15 | 0,50 | 0,84 |
| 3-Phosphoglycerinsäure | 0,46 | 0,17 | 0,52 | 0,82 |
| 2,3-Diphosphoglycerinsäure | 0,19 | 0,13 | 0,30 | 0,39 |
| Ribose-5-phosphat | 0,16 | 0,06 | 0,40 | 0,92 |
| Fructose-6-phosphat | 0,20 | 0,08 | 0,33 | 0,97 |
| Glucose-1-phosphat | 0,11 | 0,05 | 0,25 | 0,84 |
| Glucose 6-phosphat | 0,09 | 0,05 | 0,25 | 0,75 |
| Fructose-1,6-diphosphat | 0,07 | 0,04 | 0,24 | 0,53 |
| Sorbose-1-phosphat | 0,12 | 0,05 | 0,28 | 0,88 |
| Phytinsäure | 0 | 0 | 0,09 | 0,21 |
| Adenosin | 0,36 | 0,18 | 0,64 | — |
| Adenosin-3′-monophosphat | 0,09 | 0,05 | 0,47 | 1,00 |
| Adenosin-5′-monophosphat | 0,07 | 0,03 | 0,46 | 0,82 |
| Adenosin-5′-diphosphat | 0,02 | 0,01 | 0,15 | 0,66 |
| Adenosin-5′-triphosphat | 0 | 0 | 0,08 | 0,55 |
| Inosin-monophosphat | 0,05 | 0,04 | 0,33 | 0,60 |
| Inosin-5′-diphosphat | 0,02 | 0,01 | 0,10 | 0,56 |
| Inosin-5′-triphosphat | 0 | 0 | 0,05 | 0,47 |
| Uridin-monophosphat | 0,21 | 0,08 | 0,39 | 0,83 |
| Guanosin-monophosphat | 0,06 | 0,02 | 0,36 | 0,58 |
| Cytidin-monophosphat | 0,09 | 0,04 | 0,44 | 0,87 |
| Diphosphopyridinnucleotid | 0 | 0 | 0,07 | — |
| Triphosphopyridinnucleotid | 0 | 0 | 0,05 | 0,54 |
| Thiamin-monophosphat | 0,11 | 0,09 | 0,66 | — |
| Cocarboxylase | 0,02 | 0,02 | 0,33 | 0,58 |
| Flavinmononucleotide | — | 0,08 | — | — |

[1] Kreatinphosphat spaltet in den sauren Lösungsmitteln I, II und III seinen Phosphat-Rest hydrolytisch ab; daher nähern sich seine $R_f$-Werte denen vom Orthophosphat an.

## Besprechung.

Die Kombination von mehreren organischen Komponenten zu einem langsam wandernden Lösungsmittel bringt im Gegensatz zu bekannten, aus zwei oder drei Bestandteilen zusammengesetzten oder den schnell wandernden Lösungsmitteln einige grundsätzliche Vorteile:

1. Die Anwesenheit verschiedener Kat- und An-Ionen in mäßigen Konzentrationen im Gewebsextrakt sowie im Chromatogramm-Papier beeinträchtigt ebensowenig die scharfe Lokalisation von P-Estern wie die Trennbarkeit chemisch sehr ähnlicher Verbindungen. Es können daher saure, neutralisierte und ammoniakalische bzw. alkalische Extrakte mit solchen Lösungsmitteln chromatographiert werden.

2. Eine Anreicherung von Gewebsextrakten auf dem Papier zur Erfassung von den in geringer Menge vorkommenden P-Verbindungen neben dominierenden Bestandteilen führt erst unter extremen Konzentrationsbedingungen zu Überladungseffekten („Straßen- und Schwanzbildung", unzureichende Trennung und ähnliches).

3. Kleinermolekulare P-Verbindungen (Orthophosphat, Phosphoglycerinsäure, Phospho-enol-brenztraubensäure, Glycerophosphat, andere Triosephosphate, Kreatinphosphat) lassen sich trotz ihrer geringen Löslichkeit in organischen Solvenzien mit wasserfreien Lösungsmitteln sehr gut voneinander trennen (Lösungsmittel I u. II).

4. Der Zusatz von 8-Oxychinolin zu ammoniakalischen Lösungsmitteln führt durch die Bindung störender Erdalkali- und Schwermetall-Ionen zu verbesserten Trenneffekten, besonders bei Nucleotiden (Lösungsmittel IV, V, VI).

5. Gleichzeitige Zugabe von Dinatriumdihydrogen-aethylendiamintetraacetat und 8-Oxychinolin zu ammoniakalischen Lösungsmitteln verhindert das Auftreten störender UV-absorbierender Banden und bewirkt eine scharfe Lokalisation der mit Erdalkali-Ionen sehr stabile Komplexe bildenden Phytinsäure.

6. Durch den zeitlich verlängerten Chromatographievorgang bei der Anwendung langsam wandernder Lösungsmittel erfolgt bei keiner der untersuchten Substanzen eine nachweisbare Aufspaltung labiler P-Bindungen (vgl. aber die Fußnote der $R_f$-Wert-Tabelle).

Alle hier beschriebenen Lösungsmittel wurden in ein- und zweidimensionaler Arbeitsweise zur Auftrennung von 23 verschiedenen säurelöslichen Phosphor-Verbindungen aus Nierengewebe bereits angewendet (Gerlach u. Weber).

*Verwendete Testsubstanzen.* Na-Kreatinphosphat, Di-Ag-Acetylphosphat, Phospho-enol-brenztraubensäure (Ag-Ba-Salz), Na-Glycerophosphat, 2- und 3-Phosphoglycerinsäure (Ba-Salze), Di-K-Glucose-1-phosphat, Ba-Glucose-6-phosphat, Sorbose-1-phosphat, Adenosin-5′-monophosphorsäure = 5′-AMP, Ba-Inosin-5′-triphosphat = 5′-ITP, Di- und Triphosphopyridinnucleotid = DPN u. TPN, Thiaminmonophosphorsäure, Cocarboxylase und Flavinmononucleotide wurden uns von

Herrn Prof. Dr. H. A. Krebs und Herrn Dr. R. E. Davies (British Medical Research Council, Unit for Research in Cell Metabolism, Dept. of Biochemistry, University of Oxford) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Brucinsalz der 2,3-Diphosphoglycerinsäure wurde uns liebenswürdigerweise von Herrn Prof. Dr. O. Warburg (Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem) überlassen.

Adenosin-5′-triphosphat = 5′-ATP (tert. Na-Salz), Adenosin-3′-monophosphorsäure = 3′-AMP, Adenosin-5′-monophosphorsäure = 5′-AMP, Inosin-monophosphorsäure = IMP und Guanosin-monophosphat (Na-Salz) = GMP von der Zellstoff-Fabrik *Waldhof*, Mannheim-Waldhof.

3-Phosphoglycerinsäure (Ba-Salz) und verschiedene Präparate von Diphosphopyridinnucleotid (DPN 75, DPN 95 und hydriertes DPN) von der Firma C. F. *Boehringer & Söhne*, Mannheim.

Cytidin-monophosphorsäure = CMP von der Chem. Fabrik *Deutsche Hoffmann-La Roche*, Grenzach/Baden.

Guanosin-monophosphat (Na-Salz) = GMP und Fructose-1,6-diphosphat (Ba-Salz) von dem Chem.-pharm. Werk Dr. *Georg Henning*, Berlin-Tempelhof.

Uridin-monophosphorsäure = UMP von der Firma *Light* & Co. Ltd., England.

Ribose-5-phosphat (Ba-Salz) von der Chem. Fabrik *Fluka* A.G., St. Gallen.

Na-Salz der Inosithexaphosphorsäure (= Phytin-saures Na) von der *Ciba* A.G., Wehr/Baden.

Fructose-6-phosphat wurde durch saure Hydrolyse von Fructose-1,6-diphosphat und Ba-Fraktionierung als chromatographisch einheitliche Substanz selbst hergestellt.

## Zusammenfassung.

Die Eigenschaften von einigen neuen, für die papierchromatographische Trennung zahlreicher Phosphorsäure-Ester aus verschiedenen Gewebsextrakten geeigneten Lösungsmitteln werden besprochen. Ammoniakalische Lösungsmittel mit einem Zusatz von 8-Oxychinolin bzw. 8-Oxychinolin und Dinatriumdihydrogen-aethylendiamintetraacetat erweisen sich als besonders geeignet für die scharfe Lokalisation von Nucleotiden und Phytinsäure.

Mit vier Lösungsmitteln ermittelte $R_f$-Werte reiner Testsubstanzen von 31 Phosphor-Verbindungen werden mitgeteilt.

Dem Deutschen Komitee des „*Williams-Waterman Fund of the Research Corporation (New York)*“ gilt unser besonderer Dank für die materielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. A. Krebs, Herrn Prof. Dr. O. Warburg und Herrn Dr. R. E. Davies sind wir für die freundliche Überlassung von Testsubstanzen sehr dankbar.

Den Firmen Zellstoff-Fabrik *Waldhof*, *C. F. Boehringer & Söhne*, *Deutsche Hoffmann-La Roche*, Dr. *Georg Henning* und *Ciba* A.G. möchten wir auch an dieser Stelle nochmals für die uns zur Verfügung gestellten Präparate danken.

## Literatur.

Bandurski, R. S., and B. Axelrod: The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. J. of. Biol. Chem. **193**, 405 (1951). — Eggleston, L. V., and R. Hems: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochemic. J. **52**, 156 (1952). — Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Papierchromatographische

Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Tauben-Erythrocyten verschiedenen $K^+$-Gehalts. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 531 (1953). — Fleckenstein, A., u. J. Janke: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177 (1953). — Gerlach, E., u. E. Weber: Papierchromatographische Trennungsmethode für die säurelöslichen Phosphorverbindungen aus Nierengewebe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 496 (1955). — Gerlach, E., u. H. J. Döring: Schnell-Identifizierung von Adenin, Adenosin, Adenosinphosphorsäuren und Pyridinnucleotiden in Papierchromatogrammen. Naturwissenschaften (im Druck). — Hanes, C. S., and F. A. Isherwood: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — Markham, R., and J. D. Smith: Chromatographic studies of nucleic acids. 1. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. Biochemic. J. **45**, 294 (1949). — Zetterström, R., and M. Ljunggreen: The renewal of phosphate in acid soluble nucleotides in the liver and the brain. Acta chem. scand. (Copenh.) **5**, 291 (1951).

Dr. E. Gerlach, Heidelberg, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 18—35 (1955).

Aus den Wissenschaftlichen Laboratorien der Knoll AG, Ludwigshafen a. Rh.

# Über 3-Piperidino-1-phenyl-1-bicycloheptenyl-propanol-(1) (Akineton).

Von

H. Haas und W. Klavehn.

*(Eingegangen am 24. Februar 1955.)*

Bei den extrapyramidalen Störungen haben sich die Alkaloide der Atropin- und Scopolamin-Gruppe seit langem in der Therapie als nützlich erwiesen. Die wirksame Behandlung bei diesen Krankheitsbildern erfordert jedoch in der Regel hohe Dosen, die bis in den toxischen Bereich hineinreichen können. Infolgedessen ist es kaum vermeidbar, daß sich im Laufe der Behandlungsdauer unerwünschte Nebenwirkungen einstellen, die meist in einer Beeinflussung der sekretorischen Funktionen bzw. einer Beeinträchtigung des Magen-Darm-Tractus sowie einer anhaltenden Lähmung der Akkomodationsfähigkeit bestehen. Trotzdem kann man auf Grund dieser Erscheinungen die Therapie nicht plötzlich abbrechen, da sich eine derartige Maßnahme unter Umständen ebenfalls für den Kranken ungünstig auswirkt.

Bis vor wenigen Jahren wurden diese unangenehmen Begleitsymptome in der Therapie der extrapyramidalen Störungen als ein unvermeidbares Übel angesehen, weil alle Erfahrungen darauf hinzudeuten schienen, daß die peripheren anticholinergischen Wirkungskomponenten zu dem Gelingen des angestrebten therapeutischen Effektes ursächlich beitragen. Durch die Einführung neuartiger Substanzen, die bei erhöhter Verträglichkeit und einer geringeren Häufigkeit der Nebenwirkungen ebenfalls günstige Erfolgsaussichten versprechen, ist diese These, daß die erwünschte Wirkung auf das extrapyramidale System einen intensiven anticholinergischen Effekt voraussetzt, zweifelhaft geworden. So erreicht beispielsweise keine der neuen Verbindungen, die für die Parkinson-Behandlung empfohlen werden, in ihrer Wirkstärke zahlenmäßig den antagonistischen Effekt des Atropins gegen Acetylcholin. Andererseits verhalten sie sich bei der Untersuchung anderer Wirkungskomponenten, wie der Beeinflussung des Nicotinkrampfes, wahrscheinlich nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ abweichend vom Atropin, so daß sie trotz grundsätzlich gleichartiger Wirkungscharaktere eine eigene Gruppe mit spezifisch gefärbten Sondereigenschaften bilden, die ihre besondere Eignung bei der Behandlung dieser Krankheitsformen erklären könnten.

## Chemie.

Atropin und Scopolamin sind Ester, die bei der hydrolytischen Spaltung in einen sekundären Alkohol (Tropin bzw. Scopolin) und in die Tropasäure zerfallen. Jede dieser beiden Komponenten kann in weiten Grenzen modifiziert werden, indem sowohl das Alkamin Tropin bzw. Scopolin durch einen Aminoalkohol, wie die Tropasäure durch andere Säuren ersetzt werden darf, ohne daß der anticholinergische Wirkungscharakter verlorengeht. Auf diese Weise sind zahlreiche halbsynthetische bzw. synthetische Verbindungen hergestellt worden, die formell eine gewisse Ähnlichkeit mit den naturgegebenen Stoffen erkennen lassen und die pharmakodynamisch die gleichen Eigenschaften wie Atropin besitzen. In diese Estergruppe sind auch einige für die PARKINSON-Therapie gebräuchlichen Substanzen einzureihen.

Die breitere Analyse des Wirkungsmechanismus derartiger Stoffe durch HEYMANS und seine Mitarbeiter (HEYMANS, DE VLEESCHHOUWER, DE SCHAEPDRYVER) führte zur Einführung des Begriffes der Nicotinolytica (HEYMANS u. ESTABLE, HEYMANS u. VAN DEN HEUVEL), mit dem sich eine Testmöglichkeit für die Auswahl und Eignung von Stoffen zum Einsatz bei neurologischen Störungen verbindet.

Schon die Natur liefert in der Reihe der Tropaalkaloide einen Tropinester der Isatropasäure, das Belladonin, das nur schwach parasympathikolytisch und deutlich antikonvulsiv wirkt (HOTOVY) und bei PARKINSON-Patienten therapeutische Vorteile gegenüber den anderen Belladonnaalkaloiden bietet (BEHREND 1954, DUENSING, FINKE, LAUX). Außerdem ist der Benzhydryläther des Tropins neuerdings mit Erfolg bei PARKINSON therapeutisch eingesetzt worden (DOSHAY 1952, O'DOHERTY, TANAKA 1952). Von den synthetisch hergestellten Substanzen gehören weiterhin in diese Estergruppe der Phenylcyclopentan-carbonsäure-diäthylaminoäthyl-ester (Caramiphen), der experimentell und klinisch vielfach geprüft worden ist (DOMENJOZ, ALTWEGG, BAYÜLKEN, BICKEL, BOOIJ, BOYSEN, CAHEN, CZONICZER, DAENINCK, DAVINI, DOSHAY 1951, 1952, DUNHAM, ESSIG, EKBOM, FLEISCH, GÖKAY, GRUBER, GYBELS, HABERMAN, HARTMANN, HEUSCHER, KAJDI, LONGO, MAHAUX, MILLER, MUNCH-PETERSEN, PULVER, REUSE, ROEDER, SCHWAB, SCIARRA, SIMARRO, SIMMA, SZATMARY, TRONCONI, VOLK, ZEIHSL). Seine anfangs gerühmte klinische Überlegenheit konnte jedoch nicht vorbehaltlos bestätigt werden und hat teilweise entgegengesetzte Beurteilungen erfahren (DOSHAY, HARTMANN-VON MONAKOW), da die günstig lautenden Publikationen sich in den meisten Fällen nur auf ein kleines Beobachtungsgut stützen. Weiterhin lassen sich in die Estergruppe die durch EHRENBERG untersuchten Derivate von $\beta$-Oxysäuren einreihen; unter diesem sind dem Oxycyclohexyl- bzw. Oxycyclopentyl-phenylessigsäure-diäthylaminoäthyl-ester in Form der quartären Salze starke nicotinolytische Eigenschaften zuzuschreiben.

Etwa gleichzeitig mit der Einführung des Caramiphen berichtete SIGWALD (1947) über eine günstige Beeinflussung von PARKINSON-Kranken durch Phenothiazinderivate; von diesen wurde das N-(Diäthylaminoäthyl)-phenothiazin (Diäthazin) experimentell eingehender geprüft und für die PARKINSON-Behandlung geeignet befunden (BOVET 1946, BOOIJ, CAHEN, DAVINI, DELMAS-MARSALET, DUFF, DUREL, GIVRÉ, HEYMANS 1949, HUTCHEON, LARSON, PALMER, REUSE). Es fehlt jedoch nicht an Stimmen, die seine Brauchbarkeit bezweifeln oder ablehnen (ALBAHANY, BEHREND, DOSHAY, GRAY, GÜLCHER, DE HAAS, PILCHER). Ebenso wurde das N-(Diäthylaminopropyl)-phenothiazin (Äthopropazin bzw. Phenopropazin) für die Bekämpfung derartiger Krankheitszustände empfohlen (SIGWALD 1948, 1949, BARRADE, BEHREND, BOVET, BOOIJ, CAHEN, ELLENBOGEN, FERRARIS, GARAI, GALLAGHER, GILLHESPY, GOEDELT, GRAY, HELD, HUTCHEON, KÖPPE, MILLER, REUSE, WERNER). Außer diesen Phenothiazinderivaten sind noch Ester des Phenothiazin geprüft worden, unter denen der Phenothiazin-10-carbonsäure-diäthylaminoäthyl-ester (DAHLBOM) ähnliche Eigenschaften aufweist.

*Tabelle 1.*

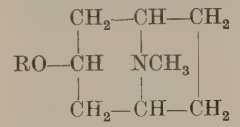
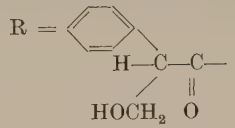
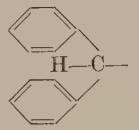
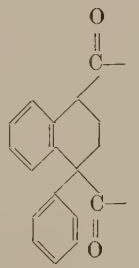
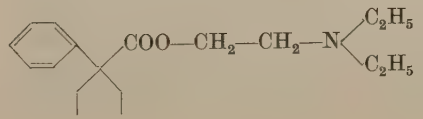
| | | |
|---|---|---|
|  |  | Atropin |
| |  | Tropin-benzhydryl-äther |
| |  | Belladonin<br>Tropinester der Isatropasäure |
|  | | Phenyl-cyclopentancarbonsäure-diäthyl-aminoäthyl-ester (Caramiphen) |

*Tabelle 1.* (Fortsetzung.)

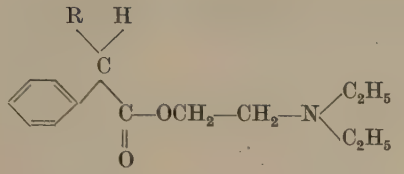
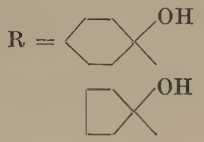
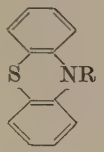
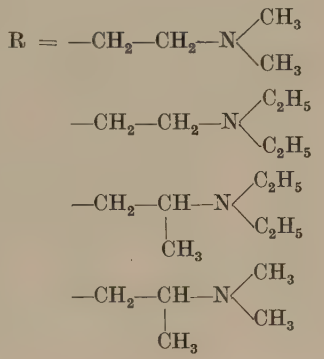
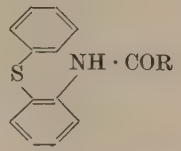
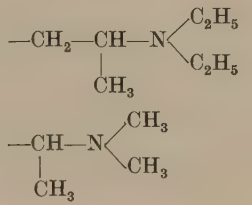
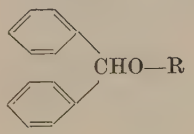
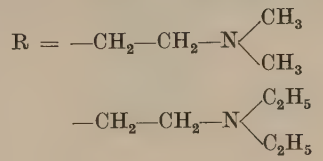
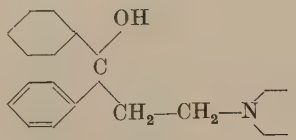
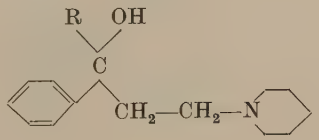
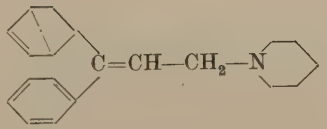
| | | |
|---|---|---|
|  |  | Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester |
| | | Oxy-cyclopentyl-phenyl-essigsäure diäthylaminoäthyl-ester |
|  |  | N-(β-Dimethylaminoäthyl)-phenothiazin |
| | | N-(β-Diäthylaminoäthyl)-phenothiazin (Diäthazin) |
| | | N-(β-Diäthylaminopropyl)-phenothiazin (Äthopropazin) |
| | | N-(β-Dimethylaminopropyl)-phenothiazin (Promethazin) |
|  |  | o-(β-Diäthylamino-propylamido)-diphenylsulfid |
| | | o-(β-Dimethylamino-propionyl-amido)-diphenylsulfid |

*Tabelle 1.* (Fortsetzung.)

| | | |
|---|---|---|
|  |  | Benzhydril-$\beta$-dimethylamino-äthyläther (Diphenhydramin) |
| | | Benzhydril-$\beta$-diäthylamino-äthyläther |
|  | | 1-Cyclohexyl-1-phenyl-3-pyrrolidino-propanol |
|  | | 1-Cyclohexyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol (Trihexyphenydyl)<br>1-Cyclopentyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol<br>1-Bicycloheptenyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol (Akineton)<br>Kl 421 = diastereomere Form<br>1-Bicycloheptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol<br>Kl 385<br>1-Bicyclo-oxy-heptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol<br>Kl 386 |
|  | | 1-Bicycloheptenyl-1-phenyl-3-piperidino-propen<br>Kl 405 |

Weiterhin sollen o-(β-Diäthylaminopropylamido)- bzw. o-(β-Dimethylaminopropionylamido)-diphenyl-sulfid einen günstigen Einfluß auf das extrapyramidale System besitzen (Knüsli).

Ein Teil der angeführten Substanzen ist chemisch engstens verwandt mit den synthetischen Antihistaminen, von denen das N-(Dimethylaminopropyl)-phenothiazin (Promethazin) und das N-(Dimethylaminoäthyl)-phenothiazin ebenfalls erprobt wurden, meist jedoch ohne große Erfolge (Sigwald 1947, 1949, Behrend, Bovet, Budnitz, Durel, Hutcheon, Laurence, Reuse). Diese Präparate stellen aber chemisch, ebenso wie das Äthopropazin und das Diäthazin, keine Ester dar und sind wie zahlreiche andere Antihistamine in die Gruppe der Äthylendiaminderivate einzureihen. Zusätzlich wurden auch Antihistamine vom Colamintyp einer Prüfung unterzogen, wobei der Benzhydryl-dimethylamino-äthyläther vor allem in der Kombination mit Scopolamin, Atropin und Trihexyphenidyl zum Teil beachtliche Besserungen erzielte (Budnitz, Blumberger, Chena, Cohen, Denker, Doshay 1951, Effron, Ekbom, Gair, Gitt, McGavack, Reuse, Ryan, Schwab, Tanaka). Ebenso soll der Diäthylaminoäthyläther des Benzhydryls (Fog, Hansen, Struppler) günstig wirken. Das N′-(Benzyl)-N′-(2-pyridyl)-N,N-dimethyl-äthylendiamin (Tripelenamin) (Budnitz, Cohen, Ekbom, Gair, Lehoczky) wird mäßig beurteilt. Das gleiche gilt für N-Benzyl-N-phenyl-2-imidazolino-methylamin (Antazolin), Phenylmethyl-2-(pyridyl)-carbinol-β-dimethyl-amino-äthyläther (Doxylamin) und 3-(Phenyl)-3-(2-pyridyl)-dimethyl-aminopropan (Prophenpyridamin) (Gair). Auch 1-Phenyl-4-methyl-3,4,5,6-tetrahydropyridinen (Phenindamin) wird verschieden, meist jedoch nicht allzu günstig bewertet (Berger, Blumberg, Cohen, Effron, Gair, Ottesen, Pecker, Tomarkin).

Bei einer weiteren Gruppe handelt es sich chemisch um tertiäre β-Aminoalkohole, unter denen 1-Cyclohexyl-1-phenyl-3-piperidinopropanol (Trihexylphenidyl) besonders gute Erfolge garantieren soll (Cunningham, Bardeci, Behrend, Booij, Canelis, Chena, Dow, Doshay 1947/49/53/54, Effron, Ekbom, Ellenbogen, Franke, Gallagher, Garai, Goebel, Haglund, Harris, Laurence, Lenz, Lhermitte, Longo, van Meter, Palmer, Phillips, Priddle, Raffle, Remouchamps, Roeder, Schwab 1949, Shapiro, Steincke, Wright). Es gibt jedoch auch hier ablehnende oder skeptische Beobachter (Berkowitz, Corbin, Müller, Schlusinger, Salzer, Zerbini). Daneben werden aus dieser Stoffklasse 1-Cyclohexyl-1-phenyl-3-pyrrolidinopropanol (Montuschi, Miller) und 1-Cyclopentyl-1-phenyl-3-piperidinopropanol (Dow 1954, Magee, Mulder) empfohlen.

Im Vergleich zu diesen Substanzen wurden 5 weitere synthetisch hergestellte Produkte untersucht, die sämtlich bicyclische Ringe enthalten. Unter diesen zeichnet sich das 1-(Bicycloheptenyl)-1-phenyl-3-piperidinopropanol durch besonders günstige Eigenschaften aus, und es übertrifft in dieser Hinsicht alle im Vergleich geprüften Substanzen, von denen aus den bisher bekannten Verbindungsklassen Atropin, Caramiphen, Trihexyphenidyl und der Oxy-cyclohexyl-phenylessigsäure-diäthylaminoäthyl-ester in diese Versuchsreihen mit einbezogen wurden.

## Experimentelle Ergebnisse.

### *Versuche am isolierten Meerschweinchendarm.*

Trotz der teilweise beträchtlichen Abwandlung im chemischen Aufbau zeigen alle Verbindungen, soweit sie am isolierten Meerschweinchendarm nach der Methode von Magnus geprüft wurden, einen etwa gleichartigen

Wirkungscharakter. In der Tabelle sind lediglich die wirksamen Grenzkonzentrationen eingesetzt, die den durch Acetylcholin 0,02 mg/l bzw. Bariumchlorid 100 mg/l ausgelösten Krampf in der Mehrzahl der Versuche um 75% zu lösen vermögen.

Der Acetylcholin-Antagonismus ist beim Atropin am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich zu diesem benötigt man zur Beeinflussung der Acetylcholinkontraktur des Meerschweinchendarmes von allen übrigen

Tabelle 2. *Versuche am isolierten Meerschweinchendarm.* Antagonistisch wirksame Grenzkonzentrationen mg/Liter.

| Präparat | Acetylcholin 0,02 mg/Liter | Bariumchlorid 100 mg/Liter |
|---|---|---|
| Atropin | 0,003 | 300,0 |
| Papaverin | 40,0 | 20,0 |
| Trihexyphenidyl | 0,06 | 100,0 |
| Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylamino-äthylester | 0,03 | 50,0 |
| Akineton | 0,08 | 20,0 |
| Diastereomere Form | 0,4 | 20,0 |
| l-Bicycloheptyl-1-phenyl-piperidino-propanol | 0,1 | 20,0 |
| l-Bicyclo-oxy-heptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol | 0,2 | 100,0 |
| l-Bicyclo-heptenyl-l-phenyl-3-piperidino-propen | 1,0 | 10,0 |

Substanzen erheblich höhere Konzentrationen; trotzdem ist die anticholinergische Wirkungskomponente deutlich zu erkennen. Dazu kommt ein schwacher muskulotroper Effekt, der zahlenmäßig, wie sich in der Lyse der Bariumkontraktur anzeigt, teilweise weit über die Wirkungsintensität des Atropins hinausgeht.

*Versuche am Blutdruck der Katze.*

Auch am Kreislaufsystem lassen sich die anticholinergischen Eigenschaften dieser Verbindungen quantitativ auswerten, wenn man als Test die durch Acetylcholin 0,1 $\gamma$/kg i. v. bzw. durch elektrische Vagusreizung ausgelöste Blutdrucksenkung an der Katze (Chloralose-Narkose 60 mg/kg s. c.) benutzt.

Die in der Tab. 3 angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf eine sichere Verhütung beider Effekte bei jeweils mehrfacher Prüfung der einzelnen Substanzen in Reihenversuchen mit aufsteigenden Dosen. Die Applikation erfolgte in allen Versuchen i. v. 1 min vor der Injektion des Acetylcholins bzw. vor der Vagusreizung. Dann wurde in 3minutigen Abständen bestimmt, wann die Reaktion des Blutdruckes auf die Acetylcholingabe bzw. die elektrische Reizung des Vagus wieder zur Norm zurückgekehrt war.

Alle angegebenen Grenzschwellendosen wirken kurzdauernd, so daß in der Regel nur ein- bzw. zweimal eine vollständige Verhütung des

Blutdruckabfalles erzielt wird. Auch in diesen Versuchsreihen ist Atropin wirkungsmäßig allen anderen Stoffen weitgehend überlegen. Relativ starke anticholinergische Eigenschaften weist außerdem in diesem Test der Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester auf. Bei den übrigen Verbindungen ergibt sich eine gleitende Skala der antagonistisch wirksamen Dosen, wobei das Akineton von diesen hinsichtlich des

Tabelle 3. *Antagonistisch wirksame Dosen mg/kg i.v. am Blutdruck der Katze.*

| Präparat | Acetylcholin 0,1 γ/kg i. v. | Vagusreiz |
|---|---|---|
| Atropin | 0,0005 | 0,005 |
| Caramiphen | 2,0 | 2,0 |
| Trihexyphenidyl | 0,2 | 0,5—1,0 |
| Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylamino-äthylester | 0,025 | 0,1 |
| Akineton | 0,1 | 0,1 |
| Diastereomere Form | 0,2 | 0,2 |
| 1-Bicycloheptyl-1-phenyl-piperidino-propanol | 0,5 | 1,0 |
| 1-Bicyclo-oxy-heptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol | 0,5 | 1,0 |
| 1-Bicyclo-heptenyl-1-phenyl-3-piperidino-propen | 1,0 | 2,0 |

Acetylcholin-Antagonismus wie in der Unterdrückung des Vagusreizes die kleinsten Dosen benötigt.

Weiterhin läßt sich der durch 75 γ/kg Veratrin i. v. gesetzte Blutdruckabsturz mit Akineton im Katzenversuch antagonistisch beeinflussen. Am unbehandelten narkotisierten Tier (Chloralose-Narkose 60 mg/kg s. c.) erfolgt bei der Anwendung dieser Veratringabe im Mittel eine Blutdrucksenkung von 120 mm Hg und eine Minderung der Pulsfrequenz von durchschnittlich 160 auf 60—65 Schläge pro Minute. Nach der Applikation von 3 mg/kg Akineton i. v. ist der Veratrineffekt vollkommen unterdrückt, so daß ein Absinken des Blutdruckes nicht mehr stattfindet und auch die Frequenz sich nicht mehr ändert. Für Trihexyphenidyl konnten die gleichen Beobachtungen bei der Anwendung von 3 mg/kg i. v. gemacht werden. 1,0 und 2,0 mg/kg schwächen bei beiden Präparaten den Veratrineffekt bereits deutlich ab, insbesondere wird die Änderung der Pulsfrequenz weitgehend unterdrückt oder auf ein Minimum beschränkt.

Vom Caramiphen werden 5 mg benötigt, um den Blutdruckabfall des Veratrin aufzuheben. Atropin erzielt sogar in Dosen bis 5 mg nur eine geringe Abschwächung der durch Veratrin bedingten Drucksenkung (Fleckenstein). Der Antiveratrineffekt geht demnach nicht mit der anticholinergischen Wirkungsintensität parallel. Fleckenstein nimmt deshalb an, daß er mit einer lokalanaesthetischen Wirkungskomponente

zusammenhängt. Da Akineton derartige Eigenschaften bei der Prüfung an der Kaninchen-Cornea selbst in 2%iger Lösung vermissen läßt, dürfte die Antiveratrinwirkung bei dieser Substanz, ähnlich wie sein Antinicotineffekt (siehe diesen), darauf hinweisen, daß Akineton spezielle chemozeptive Funktionen zu beeinflussen vermag, wobei es vermutlich weniger an den Receptoren selbst als an den ganglionären Synapsen angreift und hier direkt bzw. mittels einer Reaktion auf die Überträgersubstanz Acetylcholin die Transmission hemmt und so den Reizeffekt abschwächt bzw. auslöscht.

*Broncholytische Wirkung.*

Die anticholinergische Wirksamkeit gibt sich weiterhin bei der Prüfung der broncholytischen Eigenschaften an der narkotisierten Katze (Chloralose-Narkose 60 mg/kg s. c.) unter Verwendung der Methode von Konzett zu erkennen. Zur Auslösung des Bronchospasmus wurde Pilocarpin in einer Dosis von 3 mg/kg i. v. benutzt. Eine Lyse um 50% erzielt Atropin unter diesen Versuchsbedingungen in einer Gabe von 0,01 mg/kg i. v. Von Trihexyphenidyl werden 1,0 mg/kg i. v. benötigt. Das gleiche gilt für Akineton und 1-Bicyclo-oxyheptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol, während der Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester schon in Gaben von 0,05 mg/kg i. v. den gleichen antagonistischen Effekt verursacht. Im Bereich der genannten Dosen hält die Wirkung bei allen geprüften Verbindungen etwa 10—15 min lang an.

*Wirkung auf die ganglionären Umschaltestationen und die Blutdruckreaktion von Adrenalin und Nicotin.*

Die durch präganglionäre Reizung des Halssympathicus erzeugte Nickhautkontraktur wird von allen untersuchten Substanzen im Versuch an der narkotisierten Katze (Chloralose-Narkose 60 mg/kg) in Dosen bis zu 5 mg/kg i. v. nicht beeinflußt. Ebenso erwies sich die durch Adrenalin 0,01 mg/kg i. v. ausgelöste Kontraktur der Nickhaut nicht unterdrückbar; sie wird sogar im Gegenteil durch Akineton und dessen diastereomerer Form kurze Zeit nach der Applikation deutlich verstärkt. Parallel damit nimmt auch die Adrenalin-Blutdruckreaktion an Intensität zu. Andererseits kann der Nicotineffekt (0,015 mg/kg i. v.) auf die Nickhaut und auf den Blutdruck bereits durch Dosen von 2 mg Akineton völlig unterdrückt werden. Auch die diastereomere Form ist unter diesen Versuchsbedingungen nicotin-antagonistisch wirksam, wenn auch schwächer als das Akineton.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die ganglionären Schaltapparate durch Acetylcholingaben von 0,25 mg/kg i. v. in Erregung versetzt, nachdem zuvor die peripheren Endstufen des parasympathischen Systems durch hohe Dosen von Atropin (6—7 mg/kg i. v. in Einzeldosen

von 1—2 mg) vollständig gelähmt waren. Bei diesem Vorgehen löst Acetylcholin eine Blutdrucksteigerung aus, die bei Blockade der Ganglien in eine Blutdrucksenkung umschlägt oder sich durch eine Aufhebung der Blutdrucksteigerung zu erkennen gibt. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigen alle Prüfsubstanzen mit Ausnahme von Atropin in Dosen von 5 mg/kg i. v. eine weitgehende antagonistische Wirksamkeit. Man ist

Tabelle 4. *Antagonistisch wirksame Gaben (Katze i.v. mg/kg).*

| Präparat | Nickhautkontraktur | | | Blutdruck |
|---|---|---|---|---|
| | Präganglionäre Reizung | Nicotin i. v. 0,015 mg/kg | Adrenalin i. v. 0,01 mg/kg | Atropinisierte Katze, Acetylcholin 0,25 i. v. mg/kg |
| Atropin . . . . . | 5,0 unbeeinfl. | 5,0 unbeeinfl. | 5,0 unbeeinfl. | 5,0 unbeeinfl. |
| Trihexyphenidyl . . . | 5,0 „ | 5,0 „ | 5,0 „ | 5,0 aufgeh. |
| Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthyl-aminoäthylester. . . | 5,0 „ | | | 5,0 abgeschw. |
| Akineton. . . . . | 5,0 „ | 2,0 aufgeh. | 0,5—2,0 verstärkt | 5,0 Umkehr |
| Diastereomere Form . . | 10,0 „ | 5,0 abgeschw. | 0,5—2,0 verstärkt | 5,0 abgeschw. |
| 1-Bicycloheptyl-1-phenyl-piperidino-propanol . . . . . | 5,0 „ | | | 5,0 Umkehr |
| 1-Bicyclo-oxy-heptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol . . . . . | 5,0 „ | | | 5,0 aufgeh. |

demnach versucht, übereinstimmend mit Bovet u. Longo (1951) anzunehmen, daß diese Mittel in höheren Dosen durch eine Blockierung der cholinergischen Übertragung in den ganglionären Umschaltestationen wirken.

*Beeinflussung des Nicotinkrampfes der weißen Maus und Toxicität.*

Die an der Nickhaut nachgewiesene Antinicotinwirksamkeit konnte auch in Versuchen an der Maus bestätigt werden. Vorversuche an unvorbehandelten Tieren des gleichen Stammes ergaben, daß Nicotin in einer Dosis von 0,4 mg/kg i. v. bei 46 von 50 Tieren schwere Krämpfe auslöst. Für die Auswertung der Prüfsubstanzen dienten Reihenversuche unter Verwendung von je 10 Tieren pro Einzelgabe und unter Errechnung der Dosis, die 50% der Tiere gegen das Auftreten der Nicotinkrämpfe schützt. Die Applikation der Prüfsubstanzen erfolgte s. c. 15 min vor der i. v. Nicotininjektion. Die Mittelwerte sind aus der Tab. 5, zusammen mit den Ergebnissen der Toxicitätsversuche, zu entnehmen. Auch diese beziehen sich auf Reihenversuche an weißen Mäusen bei s. c. und i. v.

Applikation mit je 6 Tieren pro Einzelgabe und unter Berechnung der 50% wirksamen Dosen nach dem Verfahren von Kaerber.

Für Akineton wurde zusätzlich die Verträglichkeit per os festgestellt. Die mittlere tödliche Dosis liegt bei 545 mg/kg. Das Vergiftungsbild ist gekennzeichnet durch ataktische Störungen und Lähmungserscheinungen, die anfallsweise von Krampfbewegungen und klonischen Krämpfen unterbrochen werden.

Der Antagonismus gegen Nicotin ist am stärksten beim Akineton ausgeprägt, wenn man als Maß die zur Unterdrückung der Nicotinkrämpfe benötigten Wirkdosen benutzt. In dieser Hinsicht übertrifft es alle

Tabelle 5. *Antinicotinwirkung und Toxicität Maus.*

| Präparat | Nicotin 0,4 mg/kg i. v. antagonist-wirksame Grenzkonzentration mg/kg | $DL_{50}$ Maus mg/kg s. c. | $DL_{50}$ Maus mg/kg i. v. |
|---|---|---|---|
| Atropin | > 30,0 | 800,0 | 78,0 |
| Caramiphen | 8,8 | | 67,5 |
| Trihexyphenidyl | 25,4 | 202,0 | 41,0 |
| Äthopropazin | > 20,0 | | |
| Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylamino-äthylester | 5,9 | 320,0 | 65,0 |
| Akineton | 4,6 | 195,0 | 56,0 |
| 1-Bicycloheptyl-1-phenyl-piperidino-propanol | 26,2 | 230,0 | 32,0 |
| 1-Bicyclo-oxy-heptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol | 24,3 | 270,0 | 57,0 |
| 1-Bicyclo-heptenyl-1-phenyl-3-piperidino-propen | 5,3 | | 21,0 |

anderen geprüften Versuchssubstanzen. Dieses Ergebnis bestätigt sich, wenn man im Antinicotinversuch die mittlere Schutzdosis gegen eine am unvorbehandelten Tier absolut tödliche Nicotindosis (0,6 mg/kg i. v.) ermittelt. Unter diesen Bedingungen wurde die 50%ige Schutzdosis für Akineton mit 5,2 mg/kg s. c. gefunden, wobei die Zufuhr des Akineton wiederum 15 min vor der Nicotininjektion i. v. erfolgt. Auf Grund dieser starken nicotin-antagonistischen Eigenschaften ergibt sich eine recht günstige therapeutische Wirkungsbreite, da bereits eine Dosis, die um das 40fache unterhalb der s. c. tödlichen Gabe liegt, gegen relativ hohe Nicotindosen zu schützen vermag. Beim Trihexyphenidyl beträgt dagegen die therapeutische Breite etwa 1:8 und nur beim Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester wird eine gleich günstige therapeutische Breite erreicht.

Im Gegensatz zu der guten Antinicotinwirksamkeit übt Akineton in einer Dosierung von 1—10 mg keinen Einfluß auf die Cardiazol-Krampfdosis aus.

In der Literatur liegen eine Reihe vergleichbarer Resultate für die Unterdrückung des Nicotinkrampfes nach der von Bovet u. Longo (1951) beschriebenen Versuchsanordnung für Kaninchen vor. Diese Zahlenwerte sind für die einzelnen Präparate geordnet nach den Untersuchern in der Tab. 6 zusammengestellt.

Auch diese Angaben beziehen sich auf Dosen, bei denen 50% oder mehr der untersuchten Kaninchen nicht mit Krämpfen reagieren. Außerdem liegen Vergleichszahlen von Hardt u. Hotovy vor, die an Ratten fanden, daß am unbehandelten Tier 0,234 mg/kg Nicotin Erregungserscheinungen mit Zuckungen und Konvulsionen auslösen. Eine Vorbehandlung mit 50 mg/kg s. c. Atropin setzt die Nicotin-Krampfdosis bei i. v. Applikation auf 0,350 mg/kg herauf. Caramiphen verschiebt in einer Dosis von 10 mg/kg i. m. die Krampfschwelle des Nicotins auf 0,400 mg/kg.

Tabelle 6. *Hemmung der Nicotinkrämpfe im Kaninchenversuch.*

| Präparat | D. Bovet u. V. G. Longo: J. Pharm. a. Exper. Ther. **102**, 22 (1951). | R. L. Cahen u. T. E. Lynes: J. Pharm. a. Exper. Ther. **103**, 44 (1951). R. L. Cahen, J. M. Thomas u. K. M. Tvede: J. Pharm. a. Exper. Ther. **107**, 424 (1953). | R. Dahlbom, T. Edlund, T. Ekstrand u. A. Katz: Arch. int. Pharm. dyn. **90**, 241 (1952). | M. H. Ehrenberg, J. A. Ramp, E. W. Blanchard u. G. R. Trewes: J. Pharm. a. Exper. Ther. **106**, 141 (1952). | D. R. Laurence and R. S. Stacey: Brit. J. Pharm. **8**, 62 (1953). |
|---|---|---|---|---|---|
| Atropin . . . . . | > 10,0 | 40,0 | | | > 15,0 |
| Caramiphen . . . . . | 5,0 | 1,8 | 10,0 | 5,0 | |
| Diäthazin . . . . . | 5,0 | 3,7 | > 10,0 | | 15,0 |
| Äthopropazin . . . . | | | 6,0 | | |
| Phenothiazin-10-carbonsäure-diäthylaminoäthyl-ester . . . . | | | 2,0 | | |
| Trihexylphenidyl. . . | 5,0 | 3,3 | | 5,0 | 15,0 |
| N-(β-Dimethylaminopropyl)-phenothiazin | 5,0 | | > 10,0 | | > 15,0 |
| Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester . . | | | | 2,0 | |

Wenn in den Versuchen am Kaninchen zum Teil kleinere antagonistisch wirksame Grenzkonzentrationen als in den eigenen Untersuchungsreihen ermittelt wurden, so beruht dies sicherlich auf Abweichungen in der Methodik und insbesondere auf der Wahl des Testobjektes, das im Kaninchenversuch in der Beurteilung leichter Muskelzuckungen besteht, während bei den eigenen Ergebnissen das Auftreten schwerer Konvulsionen bzw. deren Unterdrückung als Wertmaßstab zugrunde gelegt wird. Die Hemmung der Nicotinkrämpfe wird vielfach als ein Beweismittel für das Vorhandensein einer Anti-Parkinson-Wirkung betrachtet, da bei der Untersuchung des Diäthazin, Äthopropazin und Promethazin sich weitgehende Parallelen zwischen der Verhütung der Nicotinvergiftungserscheinungen und der klinischen Wirksamkeit bei der Behandlung von Parkinson-Kranken ergaben (Bovet 1950). Trotzdem muß es zweifelhaft erscheinen, ob diese Versuchsanordnung eine einwandfreie Beurteilung für die Einsatzfähigkeit derartiger Wirkstoffe bei extrapyramidalen Störungen gestattet, weil in der Klinik bewährte Substanzen, wie Atropin und Scopolamin, unter diesen Versuchsbedingungen kaum einen Effekt

zeigen. Andererseits ist aus diesen Versuchen wohl die Schlußfolgerung erlaubt daß nicotin-antagonistisch wirksame Stoffe einen dämpfenden Einfluß auf propriozeptive Reflexe ausüben, der sich bei der Behandlung motorischer Störungen günstig auswirken kann. Eine Beschränkung des Angriffspunktes auf die peripheren Endstufen des parasympathischen Systems als Ursache für den nicotin-antagonistischen Effekt dürfte sicherlich abzulehnen sein, da sonst Atropin und Scopolamin ebenfalls antagonistisch wirksam sein müßten. Ebenso ist der Antinicotineffekt nicht durch eine curareähnliche Wirkung zu erklären, da die meisten quartären Ammoniumbasen sowie d-Tubocurarin in dieser Versuchsanordnung ohne Einfluß bleiben. Schließlich besteht auch keine Korrelation zwischen der Aufhebung der Nicotinkrämpfe bzw. der Nicotin-Blutdruckreaktion und der Blockierung der Blutdruckwirkung von Adrenalin. Nicotinolytica brauchen demnach nicht adrenergisch blockierende Wirkungsmechanismen zu entfalten.

*Beeinflussung der elektrisch gereizten Kaumuskulatur an der narkotisierten Ratte.*

Der Einfluß des Akineton, Caramiphen und Trihexyphenidyl auf die quergestreifte Muskulatur wurde nach der von Eichholtz u. Hotovy angegebenen Methode zur Registrierung der Muskelleistung an der narkotisierten Ratte (Avertin 3% 1,5 cm³/100 g s. c.) untersucht. Als Maß für die Wirkungsintensität wurde der Antagonismus gegen Prostigmin benutzt, das bei intravenöser Zufuhr in Dosen von 0,01 mg/kg die Leistung der Kaumuskulatur um das 2—3fache steigert. Unter diesen Versuchsbedingungen hebt Akineton nur in relativ hohen Dosen von 10—15 mg/kg den Prostigmineffekt auf. Das gleiche gilt für Triphenyhexyl-phenidyl. Vom Caramiphen werden sogar 15—20 mg/kg i. v. in Übereinstimmung mit den Befunden von Hardt u. Hotovy benötigt. Dieser Test ist demnach weniger geeignet, um charakteristische Unterschiede in der Wirkungsintensität quantitativ abzugrenzen, da sich die einzelnen Verbindungen in höheren Dosierungsbereichen offenbar weitgehend ähnlich verhalten. Auch in der Wirkungsdauer sind alle geprüften Substanzen etwa gleich zu beurteilen. Man wird aber in diesen Ergebnissen sicherlich eine weitere Stütze für die Annahme sehen dürfen, daß derartige Stoffe auf spastische Reizzustände der quergestreiften Muskulatur unter Umständen günstig einwirken können.

*Beeinflussung der Speicheldrüsensekretion.*

Für den therapeutischen Einsatz spielt die allgemeine Verträglichkeit, abgesehen von der Toxicität, eine wesentliche Rolle, da — wie die Beobachtungen mit Atropin und Scopolamin zeigen — insbesondere die Nebenwirkungen auf die sekretorischen Funktionen die klinische Verwendbarkeit einschränken oder mindestens eine erhebliche Belastung für den Patienten bedeuten.

Zur Abgrenzung dieser Wirkungskomponenten wurden Versuche am Kaninchen in leichter Urethan-Narkose (0,5 g/kg per os) durchgeführt. Die Tiere erhielten außerdem 50 cm³/kg Wasser per os und 2,0 mg/kg s. c. Pilocarpin bzw. die gleiche

Pilocarpin-Dosis und zusätzlich, getrennt vom Pilocarpin injiziert, die einzelnen Prüfsubstanzen in verschiedener Dosierung. Die ausgeschiedenen Speichelmengen wurden 1 Std lang in Abständen von 5 min bestimmt und der Effekt im Vergleich zu dem Ablauf der Kontrollkurven unter planimetrischer Auswertung der einzelnen Kurvenscharen in Prozent der Norm berechnet. In der Tab. 7 ist die Hemmung der Speichelsekretion in Prozent für die einzelnen Dosen jeweils eingesetzt; unter Zugrundelegung dieser Zahlenwerte ist die Dosis errechnet, die eine 50%ige Hemmung des Pilocarpin-Speichelflusses am Kaninchen bewirkt.

Tabelle 7. *Pilocarpin-Speichelfluß am Kaninchen. 2,0 mg/kg. Hemmung in Prozent der Norm.*

| Präparat | Dosis mg/kg s. c. | | | | | | 50% ED |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,50 | 0,30 | 0,20 | 0,10 | 0,03 | 0,01 | |
| Atropin . . . . . | | | 72,8 | 44,3 | 1,3 | | 0,12 |
| Trihexyphenidyl. . . . . | 65,2 | | | 16,0 | | | 0,38 |
| Oxy-cyclohexyl-phenylessigsäure-diäthylaminoäthylester . . . . . | 89,5 | | | 45,9 | | 7,6 | 0,14 |
| Akineton . . . . . | 86,1 | 41,0 | | 36,2 | | | 0,34 |

Wenn man diese 50%igen Wirkdosen vergleicht, so verhalten sich Trihexyphenidyl und Akineton günstiger als Atropin und der Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester, da eine Beeinflussung der sekretorischen Funktionen im Vergleich zu diesen bei Akineton und Trihexyphenidyl an verhältnismäßig hohe Dosen geknüpft ist.

Tabelle 8. *Mäuseauge. Pupillenerweiterung in Prozent.*

| Präparat | Dosis mg/kg s. c. | | | | | | | | | | 50% ED |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 12,5 | 5,00 | 1,50 | 0,70 | 0,50 | 0,35 | 0,15 | 0,05 | 0,03 | 0,015 | |
| Atropin . . . . . | 97,0 | | 80,0 | 86,0 | 60,9 | | 64,0 | 32,8 | | 25,5 | 0,11 |
| Trihexyphenidyl. . . | 70,6 | 73,5 | 66,0 | 55,0 | 42,2 | | 26,1 | 20,4 | | | 0,62 |
| Oxy-cyclohexyl-phenylessigsäure-diäthylaminoäthylester . . . . . | | 60,0 | 55,8 | 53,3 | 52,4 | | 41,3 | 20,8 | 21,9 | | 0,45 |
| Akineton . . . . . | 97,9 | | 68,1 | 55,1 | 34,1 | 18,0 | | | | | 0,64 |
| 1-Bicycloheptyl-1-phenyl-piperidino-propanol. . . . . | 91,6 | 50,9 | 43,7 | 37,2 | 16,9 | 16,6 | | | | | 5,00 |
| 1-Bicyclo-oxy-heptyl-1-phenyl-3-piperidino-propanol . . . | 64,9 | 27,0 | 16,6 | 13,3 | 13,9 | | | | | | 9,50 |

*Beeinflussung der Pupillenreaktion an der Maus.*

Diese Versuche wurden an der Maus nach der Methode von Pulewka durchgeführt, und zwar unter Einsatz von je 6 Tieren pro Einzelgabe und planimetrischer Auswertung der Dosiswirkungskurve. Bei der Beurteilung der Wirkstärke wurde als 100%ige Mydriasis bewertet, wenn bei den Tieren über einen Zeitraum von 180 min der Pupillendurchmesser um 400% gegenüber der Norm gesteigert ist.

Als Mittelwert an unbehandelten Tieren wurde ein Pupillendurchmesser von 0,19 mm unter den gewählten Versuchsbedingungen bestimmt. Die maximal gemessene Pupillenweite unter der größten benutzten Atropindosis bewegt sich zwischen 0,92—0,98 mm. Aus diesem Grunde wurde eine Steigerung gegenüber der Norm um 400% als totale Mydriasis gewertet.

Auch unter diesen Versuchsbedingungen schneiden Akineton und Trihexyphenidyl, s. c. zugeführt, etwa gleichartig ab, indem sich die Pupillenerweiterung erst bei der Zufuhr deutlich höherer Gaben als beim Atropin einstellt. Das 1-(Bicycloheptenyl)-1-phenyl-3-piperidino-propanol ist in dieser Hinsicht noch schwächer wirksam, da erst sehr hohe Dosen einen sicheren Effekt auf den Pupillendurchmesser erzielen. Der Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester wirkt dagegen stärker pupillenerweiternd.

## Zusammenfassung.

Bei der vergleichenden Untersuchung von Atropin, Caramiphen, Trihexyphenidyl, Äthopropazin, Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester sowie einer Reihe neuartiger synthetisch hergestellter Verbindungen, die bicyclische Ringe enthalten, ergab sich, daß Akineton und der Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester bei guter Allgemeinverträglichkeit die stärksten nicotinolytischen Eigenschaften besitzen, wenn man als Maß die zur Unterdrückung der Nicotinkrämpfe benötigten Wirkdosen zugrunde legt. Das Verhältnis der nicotinantagonistischen Gaben und der tödlichen s. c. Dosen liegt bei 1 : 40 bzw. 1 : 55. Eine solch günstige therapeutische Wirkungsbreite wurde bei keiner der anderen Prüfsubstanzen gefunden.

Für den therapeutischen Einsatz spielt, abgesehen von der Toxicität, der Umfang der Nebenwirkungen eine entscheidende Rolle; insbesondere können die Beeinflussung der sekretorischen Funktionen und die Störung der Sehfunktion die klinische Verwendbarkeit erheblich einschränken. In dieser Hinsicht schneidet das Akineton günstiger als der Oxy-cyclohexyl-phenyl-essigsäure-diäthylaminoäthyl-ester ab, da für die Hemmung der Speicheldrüsensekretion und für die Veränderung der Pupillenreaktion relativ hohe Dosen benötigt werden.

Der Nicotin-Antagonismus des Akineton erstreckt sich auch auf die nicotinbedingte Blutdruckreaktion bzw. Nickhautkontraktur. Der Einfluß von Adrenalin auf Nickhaut und Blutdruck wird dagegen nicht aufgehoben. Ebenso wird die durch präganglionäre Reizung erzeugte Nickhautkontraktur nicht durch Akineton unterdrückt. Die durch hohe Acetylcholindosen bewirkte Erregung der ganglionären Umschaltestationen läßt sich jedoch durch Akineton völlig aufheben.

Bei der Prüfung am isolierten Meerschweinchendarm sowie am Blutdruck der Katze erwies sich, daß alle geprüften Substanzen anticholinergische Eigenschaften besitzen. Diese geben sich weiterhin bei der

Prüfung der broncholytischen Wirksamkeit zu erkennen. Außerdem vermag Akineton den durch Veratrin verursachten Absturz des Blutdruckes und der Pulsfrequenz vollkommen zu unterdrücken.

Die hohen nicotinolytischen Fähigkeiten des Akineton, zusammen mit seiner guten Verträglichkeit und dem Vorhandensein einer deutlichen peripheren anticholinergischen Wirkungskomponente, lassen diese Substanz für die Behandlung extrapyramidaler Bewegungsstörungen geeignet erscheinen, zumal mit einer stärkeren Beeinträchtigung der sekretorischen Leistung und mit dem Auftreten von Akkomodationsstörungen im therapeutischen Bereich nicht zu rechnen ist.

## Literatur.

Albahany, C., et R. Caldera: Bull. Soc. méd. Hôp. Paris **66**, 738 (1950). — Altwegg, F.: Mschr. Psychiatr. **121**, 114 (1951). — Bardeci, C. A.: Prensa méd. argent. **1950**, 607. — Barrade, Y., Y. Guinena, A. H. Hassan, S. H. Naby and Y. Taher: J. Egypt. Med. Assoc. **35**, 503 (1952). — Bayülken, F.: Praxis (Bern) **1948**, 168. — Behrend, R. Ch.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 428. — Ärztl. Wschr. **1954**, 941. — Berger, F. M.: N. Y. State J. Med. **49**, 1817 (1949). — Berkowitz, B., and E. Alvermann: Arch. of Neur. **67**, 462 (1952). — Bickel, G., u. J. P. Dubois: Rev. méd. Suisse rom. **67**, 708 (1947). — Blumberg, A. G., u. B. Dattner: Zit. nach A. S. Effron u. P. G. Denker. — Booij, J.: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **1948**, 994. — Bovet, D., et G. Dumont: Soc. franç. neurol. 7. Nov. 1946. — Bovet, D., and V. G. Longo: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 22 (1951). — Bovet, D., P. Durel et V. G. Longo: C. r. Soc. Biol. Paris **144**, 514 (1950). — Boysen, K. H.: Med. Klin. **1950**, 1098. — Budnitz, J.: New England J. Med. **238**, 874 (1948). — Cahen, R. L., and T. E. Lynes: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 44 (1951). — Cahen, R. L., J. M. Thomas and K. M. Tvede: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 424 (1953). — Canelis, M., F. J. Farnell and Th. H. McGavack: Amer. J. Med. Sci. **218**, 655 (1949). — Lancet I., **1951**, 429. — Chena, W.: Prensa méd. argent. **1952**, 351. — Semaine méd. **99**, 161 (1951). — Cohen, S. G., and L. H. Criep: J. Nerv. Dis. **115**, 57 (1952). — Corbin, K. B.: Med. Clin. N. Amer. **33**, 1131 (1949). — J. Amer. Med. Assoc. **141**, 377 (1949). — Cunningham, R. W., B. K. Harned, M. C. Clark, R. R. Cosgrove, N. S. Daugherty, C. H. Hine, R. E. Vessey and N. N. Yuda: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 151 (1949). — Czoniczer, G.: Praxis (Bern) **1947**, 777. — Daeninck, L., et L. Libbrecht: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 263 (1949). — Dahlbom, R., T. Edlund, T. Eykstrand et A. Katz: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 241 (1952). — Davini, V., e A. Borellini: Minerva med. (Torino) **1948**, II, 432. — Delmas-Marsalet, P., J. Faure et L. Arne: C. r. Soc. Biol. (Paris) **144**, 1163 (1950). — Denker, P. G., and A. S. Effron: Arch. of Neur. **64**, 941 (1950). — Denton, J. J., V. A. Lawson, W. B. Neier and R. J. Turner: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 2050 (1949). — Domenjoz, R.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1286. — Domenjoz, R., E. Grünthal u. K. Hartmann: Praxis (Bern) **1946**, 882. — Doshay, L. J.: Med. Rec. **160**, 339 (1947). — Doshay, L. J., and K. Constable: J. Amer. Med. Assoc. **140**, 1317 (1949). — Neurology (Minneapolis) **1**, 68 (1951). — Doshay, L. J., K. Constable and F. Fromer: Neurology (Minneapolis) **2**, 233 (1952). — Doshay, L. J., K. Constable and A. D. Zier: J. Amer. Med. Assoc. **154**, 1334 (1954). — Doshay, L. J., and A. D. Zier: Neurology (Minneapolis) **3**, 360 (1953). — Dow, R. S., and H. Rosenbaum: Northwest Med. J. **48**, 699 (1949). — Dow, R. S., and G. N. Smith: Neurology (Minneapolis) **4**, 33 (1954). — Duensing, Fr.:

Dtsch. Z. Nervenheilk. **150**, 70 (1949). — Duff, R. S.: Brit. Med. J. **1**, 613 (1949). — Dunham, W. F., and C. A. Edwards: Lancet **1948**, II, 724. — Durel, P.: J. Méd. Lyon **706**, 431 (1949). — Effron, A. S., and P. G. Denker: J. Amer. Med. Assoc. **144**, 5 (1950). — Ehrenberg, M. H., J. A. Ramp, E. W. Blanchard and G. R. Trewes: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 141 (1952). — Eichholtz, F., R. Hotovy et H. Erdniss: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 62 (1949). — Ekbom, K. A.: Sv. Läkartidn. **1954**, 281. — Ellenbogen, B. K.: Lancet **1950**, I, 1034. — Essig, C. F., J. L. Hampson, P. D. Bales, A. Willis and H. E. Himwich: Sci. **111**, 38 (1950). — Ferguson, F. R., u. A. Liversedge: Pract. **165**, 437 (1950). — Ferraris, M.: Sistema nerv. (Milano) **6**, 61 (1949). — Fleckenstein, A., R. Muschaweck u. F. Bohlinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 132 (1950). — Finke, H.: Münch. med. Wschr. **1952**, 2279. — Fleisch, A., u. C. Baud: Helvet. physiol. Acta **6**, 331 (1948). — Fog, M.: Ugeskr. Laeg. **1950**, 748. — Franke, E., u. S. Johantson: Sv. Läkartidn. **1950**, 1718. — Gair, D. S., and J. Ducey: Arch. Int. Med. **85**, 284 (1950). — Gallagher, D. J. H.: Brit. Med. J. **1950**, 558. — Gallagher, D. J. H., and H. Palmer: N. Y. State J. Med. **49**, 273 (1950). — Garai, O.: Lancet **1951**, I, 429. — Gillhespy, J.: Brit. Med. J. **1952**, 382. — Gitt, J. J., W. M. Landau and M. H. Clare: Dis. Nerv. System **12**, 117 (1951). — Givré, A.: Prensa méd. argent. **1948**, 2148. — Acta méd. Hispan. **6**, 309 (1948). — Goebel, U.: Münch. med. Wschr. **1951**, 1082. — Goedelt, W.: Med. Klin. **1952**, 750. — Gökay, F. K., u. K. Tückel: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 582. — Gray, O.: Brit. Med. J. **1949**, 778. — Lancet **1949**, II, 34. — Gray, R. M.: Brit. Med. J. **1950**, I, 416. — Gruber, Ch. M., Ch. P. Kraatz, Ch. M. Gruber jr. and J. E. Copeland: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 11 (1949). — Grünthal, E.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1286. — Gülcher, J. W., u. J. J. Kamps: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **1953**, 816. — Gybels, J., R. Jolie et P. Vereecken: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 223 (1951). — Haas, G. de: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **1952**, 3079. — Haberman, H.: Día médico **20**, 1019 (1948). — Hardt, A., u. R. Hotovy: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 264 (1950). — Haglund, G.: Nord. Med. **45**, 919 (1951). — Hansen, E. B., u. H. Tschabitscher: Wien. med. Wschr. **1952**, 551. — Harris, T. H., and J. K. Torrens: Texas State J. Med. **46**, 514 (1950). — Hartmann, K.: Ther. Umschau **3**, 255 (1946/47). — Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1289. — Hartmann, K., u. M. Monnier: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 845. — Hartmann-von Monakow, K.: Rev. Neur. **82**, 39 (1950). — Held, Fr.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1497. — Heuscher, J. E., u. M. L. Schoelly: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 509. — Heymans, C.: Bull. Acad. méd. belg. **14**, 76 (1949). — Heymans, C., and J. J. Estable: Sci. **109**, 122 (1949). Heymans, C., J. J. Estable et S. Castillo de Bonneveaux: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 123, 185 (1949). — Heymans, C., u. G. van den Heuvel: Experentia (Basel) **5**, 213 (1949). — Heymans, C., u. G. R. de Vleeschhouwer: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 234. — Arch. internat. Pharmacodynamie **75**, 307 (1948). — Hotovy, R.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 287 (1954). — Hotovy, R., u. H. Erdniss: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 204 (1950). — Hutcheon, D. E.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 340 (1953). — Kaerber, G. K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 480 (1931). — Kajdi, L., and C. H. Williams: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **42**, 618 (1953). — Knüsli, E.: Experentia (Basel) **8**, 262 (1952). — Koeppe, H. W.: Ther. Gegenw. **1954**, 156. — Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — Larson, P. S., C. B. van Slyke, J. K. Finnegan and A. B. Haag: Sci. **111**, 476 (1950). — Laux, H.: Münch. med. Wschr. **1954**, 924. — Laurence, D. R., and R. S. Stacey: Brit. J. Pharmacol. **8**, 62 (1953). — Lehoczky, T.: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 904. — Lenz, H.: Wien. med. Wschr. **1950**, 536; **1951**, 451. — Lhermitte, E.: Semaine

Hôp. **1950**, 785. — Longo, V. G., e D. Bovet: Il Farmaco **4**, 515 (1949). — Longo, V. G., G. P. von Berger and D. Bovet: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 349 (1954). — Magee, K. R., and R. N. de Jong: Univ. Mich. Med. Bull. **19**, 59 (1953). — J. Amer. Med. Assoc. **153**, 715 (1953). — Mahaux, J., et K. Kowalewski: Acta neurol. et psychiatr. belg. **49**, 441 (1949). — Arch. internat. Pharmacodynamie **77**, 289 (1948). — McGavack, T. H., H. Elias and L. J. Boyd: Amer. J. Med. Sci. **213**, 418 (1947). — Meter, J. R. van: California Med. **73**, 322 (1950). — Miller, H.: Pract. otol. etc. (Basel) **171**, 1021 (1953). — Montuschi, E., J. Phillips, E. Prescott and A. F. Green: Lancet **1**, 583 (1952). — Müller, L., u. B. Andersson: Sv. Läkartidn. **1953**, 1088. — Mulder, D. W.: Proc. Staff Meet. Mayo Clin. **28**, 210 (1953). — Munch-Petersen, S.: Ugeskr. Laeg. **1949**, 443. — Moore, M. T.: Neurology (Minneapolis) **1**, 129 (1951). — O'Doherty, D., and F. M. Forster: Med. Ann. Distr. Columbia **1953**, 22. — Ottesen, E.: Nord. Med. **46**, 1675 (1951). — Palmer, H., and J. H. Black: New York Med. J. **48**, 487 (1949). — Palmer, H., and D. J. H. Gallagher: Lancet **1950**, II, 259. — Pecker, J.: France Med. **13**, 9 (1950). — Perrault, M., u. J. Vignalou: Therapie **1947**, 193. — Phillips, J., E. Montuschi and J. Sharkey: Lancet **1950**, I, 1131. — Pilcher, R. B.: Med. J. Austral. **1950**, 295. — Priddle, O. D., and Y. T. Oesten: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **42**, 609 (1953). — Pulver, R.: Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 185 (1951). — Raffle, R. B.: Pract. otol. etc. (Basel) **1952**, 62. — Remouchamps, L., et R. Verbeke: Press. méd. **1950**, 853. — Reuse, J. J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 117 (1952). — Roeder, F.: Landarzt **1954**, 839. — Ryan, G. M. S., and J. S. Wood: Lancet **1949**, I, 258. — Salzer, H. M.: Dis. Nerv. System **11**, 77 (1950). — Schaepdryver, G. R. de: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 359 (1949). — Schlusinger, F.: Ugesk. Laeg. **1952**, 1695. — Schwab, R. S., y D. Leigh: Prensa méd. argent. **1949**, 2597. — J. Amer. Med. Assoc. **139**, 629 (1949). — J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **9**, 439 (1948). — Schwab, R. S., and W. R. Tillmann: New England J. Med. **241**, 473 (1949). — Schwab, R. S., and J. S. Prichard: Arch. of Neur. **65**, 489 (1951). — Sciarra, D., S. Carter and H. H. Merrit: J. Amer. Med. Assoc. **141**, 1226 (1949). — Shapiro, S. K.: Minnesota Med. **35**, 1031 (1952). — Sigwald, J.: Therapie **1949**, 205. — Presse méd. **1949**, 819. — Rev. Neur. **79**, 776 (1947). — Sigwald, J., A. Grossiord, P. Durel and G. Dumont: Rev. Neur. **79**, 683 (1947). — Sigwald, J., P. Durel u. J. Pellerat: Congr. Int. Ostende, Sept. 1948. — Sigwald, J., D. Bovet and G. Dumont: Rev. Neur. **78**, 581 (1946). — Simarro, J., y J. Farré: Rev. clin. españ. **32**, 120 (1949). — Simma, K.: Mschr. Psychiatr. **114**, 119 (1948). — Steincke, K.: Nord. Med. **45**, 919 (1951). — Struppler, A.: Med. Mschr. **6**, 374 (1952). — Szatmary, H., and A. Meszaros: Monthly Rev. Psych. and Neur. **116**, 2 (1948). — Tanaka, G. M., and J. C. Edwards: J. of Gerontol. **7**, 405 (1952). — Tomarkin, P.: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 955. — Tronconi, V.: Stud. Sassaresi **26**, 5 (1948). — Vleeschhouwer, G. R. de, et R. Verbeke: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 35 (1949). — Volk, G.: Dtsch. med. Rdsch. **1950**, 122. — Werner, A.: Ther. Gegenw. **1954**, 273. — Wright, W. B.: Confinia neur. (Basel) **12**, 45 (1952). — Zeihsl, E., u. E. Drebec: Praxis (Bern) **1950**, 471. — Zerbini, E.: Note Psych. Pesaro **76**, 133 (1950).

Prof. Dr. H. Haas, Wissenschaftl. Laboratorien der Knoll AG, Ludwigshafen/Rh.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 36—45 (1955).

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West.

# Die Adsorption von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und Sulfaäthylthiodiazol an Plasmaeiweiß und ihr Einfluß auf Verteilungsvorgänge.

V. Mitteilung*.

## Ein Beitrag zur Dynamik der Verteilung.

Von

H. Langecker und H. Loppnow**.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 18. März 1955.)*

Die Verteilung eines Stoffes im Körper hängt von Diffusions- und Adsorptionsvorgängen ab und wird in ihrem Endzustand von Löslichkeits- und Adsorptionsgleichgewichten bestimmt. Die beim Eindringen in leicht zugängliche extra- und intracelluläre Gewebsanteile beteiligten Adsorptionsvorgänge verlaufen sehr rasch. Bei der Untersuchung der Verteilung auf die Blutphasen haben sich für verschiedene Stoffe beachtliche Unterschiede in der Adsorption an Plasma- und Erythrocyteneiweiß gezeigt. Die gut adsorbierbaren Verbindungen haben ein größeres Verteilungsvolumen und erreichen in Liquor und Kammerwasser höhere Konzentrationen als die schlecht adsorbierbaren (Mitt. I u. II).

Um einen Einblick in die Beteiligung der Adsorption an Verteilungsvorgängen zu gewinnen, wurde im Dialyse-Modellversuch unter Bedingungen, die die Verhältnisse bei der Verteilung in vivo hinsichtlich Eiweißgehalt in Blut bzw. Subarachnoidalraum, Augenvorderkammer und Perikardraum nachahmen, untersucht, wie sich zwei rivalisierende, durch eine Membran getrennte, gleichkonzentrierte Sulfonamidlösungen mit unterschiedlicher Plasmaeiweißkonzentration verhalten. Zur Untersuchung diente die stark dissoziierte und schlecht adsorbierbare Sulfanilsäure I, das wenig dissoziierte und gut adsorbierbare Sulfanilamid II und das mäßig dissoziierte, an Plasmaeiweiß stark adsorbierbare Sulfaäthylthiodiazol III. Die bei den Dialyseversuchen gewonnenen Ergebnisse wurden mit den für die Verteilung auf die Blutphasen in vitro und beim nierenlosen Hund gewonnenen Befunden in Beziehung gesetzt.

---

* I. Mitteilung siehe **218**, 278 (1953), II. Mitteilung **221**, 160 (1954).

** Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden von Loppnow als Dissertation an der tierärztl. Fakultät der Freien Universität Berlin verwertet.

## Methodik.

Hinsichtlich Sulfonamid-Eiweißbestimmung, Durchführung der Verteilungsversuche in vivo und in vitro, vgl. Mitt. I u. II.

*Dialyse.* Die Dialyse ist eine der ältesten Methoden für den Nachweis der Eiweißbindung. Die direkte Bestimmung der adsorbierten Menge bei einer bestimmten Konzentration ist nicht möglich, da jeder Diffusionsvorgang durch Veränderung der Konzentration ein neues Gleichgewicht zwischen gebundenem und ungebundenem Anteil zur Folge hat. Man muß daher auf die von Michaelis u. Rona vorgeschlagene Kompensationsdialyse zurückgreifen, die für Serienuntersuchungen jedoch zu umständlich ist. Wir wählten daher folgendes einfache Vorgehen: Je 20 $cm^3$ zweier Lösungen von gleichem Sulfonamidgehalt, von denen die eine unverdünntes Pferdeserum darstellte (8% Eiweiß, 760 mg-% Kochsalz, aus Trockenserum hergestellt) und die andere 760 mg-% Kochsalz mit wechselnden Eiweißkonzentrationen enthielt, wurden bei Zimmertemperatur gegen einander dialysiert. Durch Bestimmung des Sulfonamidgehaltes zu verschiedenen Zeiten wurde ermittelt, wann sich bei gleicher Konzentration in beiden wäßrigen Phasen ein neues Gleichgewicht eingestellt hat. Der Unterschied der Gesamtkonzentration in den beiden Flüssigkeiten ist durch den Unterschied an gebundenem Anteil bedingt. Die Dialyse erfolgte in Zellophanschläuchen, die in Hartglasgefäße eintauchten (Fa. Kalle & Co., Wiesbaden. Durchmesser 28 mm), bei gleichem Flüssigkeitsstand innen und außen. Im Innenraum wurde mit einem flügeltragenden Glasrührer mit 200 U/min kräftig gerührt. Die Flüssigkeit im Außenraum wurde in Abständen von 5 min durch Auf- und Abwärtsbewegung des Glases durchgemengt. Versuche mit Farbstofflösung hatten eine ausreichende Durchmischung ergeben. Da bei wiederholten Entnahmen von Lösungen für die Bestimmungen Veränderungen im Verhältnis Austauschfläche und Volumen eintreten, wurde für jede Ablesungszeit ein eigener Versuch angesetzt. Der Einfluß der Diffusionsrichtung wurde durch Vertauschen der Innen- und Außenlösung festgestellt. Bei II und III traten größere Konzentrationsverschiebungen ein, wenn die unverdünnte Eiweißlösung im Außenraum war. Bei I wurde das entgegengesetzte Verhalten beobachtet. Für die Versuche wurden jeweils die ungünstigeren Verhältnisse gewählt, d. h. bei II- und III-Versuchen die unverdünnte Serumlösung im Innenraum und bei I im Außenraum verwendet. Elektrometrische $p_H$-Bestimmungen vor und am Ende der Versuche ergaben in den Lösungen nahezu unveränderte Werte. Um fehlerhafte Membranen auszuschalten, wurden nur jene Versuche verwendet, bei denen am Ende keine größere Zunahme des Eiweißgehalts als höchstens 50 mg-% festgestellt wurde. Eine Verfälschung der Werte durch Membranadsorption ist unwahrscheinlich, da sie sich in beiden Räumen auswirken müßte.

In Tab. 1 sind die Konzentrationsveränderungen in den beiden konkurrierenden Lösungen während der Dialyse von I, II und III für die Ausgangskonzentration 10 mg-% dargestellt. (Das bei 20 und 40 mg-% Ausgangskonzentration gewonnene Zahlenmaterial kann in der Dissertation eingesehen werden.) Die drei Verbindungen haben sich bei den Dialyseversuchen hinsichtlich Grad (und Richtung) der Konzentrationsverschiebungen verschieden verhalten. III diffundiert stärker in Richtung der höheren Eiweißkonzentration als II; so war z. B. bei der Anfangskonzentration von 40 mg-% in beiden Flüssigkeiten nach Einstellung des Gleichgewichtes die Konzentration in der 8%igen Eiweißlösung um 19,3 mg-% höher als in der eiweißfreien Gegenlösung. Diese

Tabelle 1. *Konzentrationsverschiebungen von Sulfanilsäure, Sulfanilamid, Sulfaäthylthiodiazol in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt der Lösungen.* (I Innenlösung 8%ig. Eiweißlösung, II Außenlösung 760 mg-%ige NaCl-Lösung und Eiweiß in ansteigender Konzentration.)

| Eiweißkonzentration in % → | Sulfanilsäure | | Sulfanilamid | | Sulfaäthylthiodiazol | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | II | I | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II |
| | 0 | 8 | 8 | 0 | 8 | 0 | 8 | 0,5 | 8 | 1 | 8 | 2 | 8 | 4 | 8 | 6 | 8 | 7 |
| min | Die Zahlen bedeuten mg-%. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 9,6 | 9,8 | 10,1 | 10,1 | 9,4 | 9,6 | 9,3 | 9,7 | 10,4 | 10,0 | 9,3 | 9,4 | 9,8 | 10,0 | 10,2 | 10,4 | 10,4 | 10,4 |
| 40 | — | — | — | — | 10,0 | 8,2 | 10,4 | 8,6 | 11,1 | 9,3 | 9,8 | 8,5 | 10,2 | 9,1 | 10,8 | 10,1 | 10,7 | 9,9 |
| 80 | 9,4 | 9,7 | 10,3 | 9,3 | 11,6 | 7,1 | 12,0 | 7,6 | 11,5 | 8,1 | 10,8 | 8,1 | 10,5 | 8,7 | 10,8 | 9,3 | 10,5 | 9,9 |
| 160 | 9,6 | 9,2 | 10,5 | 9,3 | 12,1 | 5,9 | 12,9 | 6,4 | 12,8 | 7,3 | 11,5 | 7,5 | 10,8 | 8,4 | 10,6 | 9,0 | 10,6 | 10,1 |
| 320 | 9,6 | 9,0 | 10,6 | 9,2 | 12,3 | 4,9 | 13,1 | 6,0 | 13,3 | 6,9 | 12,0 | 7,1 | 11,2 | 7,4 | 10,7 | 9,1 | 10,9 | 10,0 |
| 480 | — | — | — | — | 13,4 | 4,7 | 13,8 | 5,9 | 13,7 | 6,7 | 12,2 | 6,7 | 11,9 | 7,0 | 11,0 | 8,9 | 11,2 | 10,3 |
| | Die Zahlen bedeuten Mehrwerte in Prozent. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | —2 | — | 0 | — | —2 | | —4 | | 4 | | —1 | | —2 | | —2 | | 0 | |
| 40 | — | — | — | — | 21 | | 21 | | 20 | | 15 | | 12 | | 7 | | 8 | |
| 80 | —3 | — | 11 | — | 63 | | 58 | | 42 | | 33 | | 21 | | 16 | | 6 | |
| 160 | 4 | — | 13 | — | 105 | | 102 | | 75 | | 53 | | 29 | | 18 | | 5 | |
| 320 | 7 | — | 15 | — | 171 | | 118 | | 98 | | 69 | | 51 | | 18 | | 9 | |
| 480 | — | — | — | — | 185 | | 134 | | 105 | | 84 | | 70 | | 24 | | 9 | |

absoluten Mehrwerte gehen der vom Eiweiß adsorbierten Menge parallel, da die Versuche im Gleichgewichtszustand den Bedingungen der Kompensationsdialyse entsprechen. In Abb. 1 ist die pro 1 g Eiweiß adsorbierte Menge III in Beziehung gebracht zur entsprechenden Gleichgewichtskonzentration in der Wasserphase. Diese Kurve entspricht der FREUNDLICHschen Adsorptionsisotherme. Die Adsorption nimmt mit steigender Konzentration entsprechend der Sättigungstendenz ab.

Die prozentuelle Zunahme ist bei geringer Sulfonamidkonzentration größer, andererseits um so kleiner, je geringer die Eiweißkonzentrations-

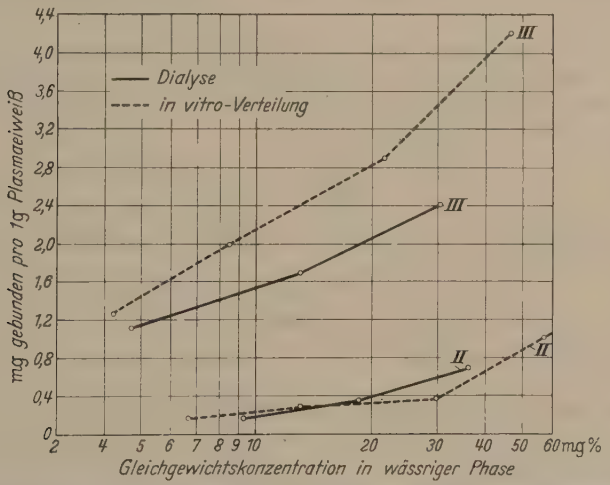



Abb. 1. Beziehungen der Gleichgewichtskonzentration in der wäßrigen Phase (Dialyse) bzw. im Blutwasser (in vitro-Versuche) zur gebundenen Sulfonamidmenge je 1 g Pferde-Plasma-Eiweiß.

unterschiede in den beiden Lösungen sind. Bei einem Eiweißgehalt von 100—200 mg-% konnte gegenüber eiweißfreier Lösung kein Unterschied in den Konzentrationsverschiebungen erkannt werden.

Bei II ist die Anreicherung in der eiweißreicheren Lösung geringer; so sind z. B. bei der Anfangskonzentration von 40 mg-% in beiden Flüssigkeiten nach Einstellung des Gleichgewichtes die Konzentrationen in der 8%igen Eiweißlösung nur um 5,6 mg-% größer als in der eiweißfreien Gegenlösung. Die von 1 g Eiweiß gebundene Menge in Beziehung zur entsprechenden Gleichgewichtskonzentration in der wäßrigen Phase ist aus Abb. 1 zu ersehen. Die Adsorption nimmt auch bei II mit steigender Konzentration entsprechend der Sättigungstendenz ab. Mit Erhöhung des Eiweißgehaltes in der Gegenlösung bzw. Abnahme des Eiweißkonzentrationsunterschiedes verringern sich die Unterschiede in der Endkonzentration.

In den Versuchen mit I nahm die Konzentration in der 8%igen Eiweißlösung während der Dialyse in der Gegenlösung ganz geringfügig zu. Die absoluten Mehrwerte in den eiweißfreien Lösungen betrugen bei einer Anfangskonzentration von 40, 20 und 10 mg-% 1,6, 0,5 und 0,6 mg-%, entsprechend 4, 3 und 7%. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Ultrafiltration, die bei Pferd und Hund im Ultrafiltrat eine gegenüber dem Plasma etwas erniedrigte Konzentration ergab. So entsprachen Plasmakonzentrationen von 92,5, 47,3, 24,6 und 13,1 mg-% I im Ultrafiltrat 91,3, 46,1, 23,2 und 12,4 mg-%. Für den Hund fehlen Dialyseversuche. Um den Einwand zu entkräften, daß das verwendete gefriergetrocknete Plasma in seiner Micellarstruktur gegen-

Tabelle 2. *Die Verteilung von Sulfaäthylthiodiazol auf die Phasen des Pferde- (I) und Hundeblutes (II) in vitro.* (Mittelwerte aus je drei Versuchen.)

| mg-% im Gesamtblut | % der Gesamtmenge in: Erythrocyten | | | | Plasma | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Wasser | | Eiweiß | | Eiweiß | | Wasser | |
| | I | II | I | II | I | II | I | II |
| 80 | 10 | 14 | 13 | 22 | 36 | 26 | 41 | 38 |
| 40 | 9 | 13 | 7 | 19 | 49 | 34 | 35 | 34 |
| 20 | 6 | 10 | 6 | 15 | 63 | 48 | 25 | 27 |
| 10 | 5 | 8 | 6 | 3 | 66 | 65 | 23 | 24 |

über dem bei der Ultrafiltration benutzten Frischplasma verändert war, wurden die Dialyseversuche mit Frischplasma wiederholt. Sie gaben dieselben Resultate.

Vielleicht ist die Übereinstimmung der Dialyse- und Ultrafiltrationsmethode doch nicht vollständig. So erfolgt die Dialyse gegenüber Kochsalzlösung und die Ultrafiltration gegenüber dem Blutwasser. Es wäre auch denkbar, daß bei der Dialyse durch das Rühren Veränderungen in der Micellarstruktur der Plasmaeiweißkörper eintreten, die bei der Ultrafiltration wegfallen.

Aus den Dialyseversuchen ergibt sich für III und II, daß die Eiweißbindung der Freundlichschen Adsorptionsisotherme gehorcht. Jede Substanz hat eine von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmte Adsorptionstendenz. Die Adsorptionstendenz der Sulfonamide gegenüber Plasmaeiweißkörpern hängt von Konstitution, Wasserlöslichkeit, Molekulargewicht, Dispersitätsgrad, elektrischer Ladung und van der Waalschen Kräften ab.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Dialyseversuche mit den Verteilungsbefunden an den Blutphasen in vitro und den in vivo gewonnenen Konzentrationsabläufen beim nierenlosen Hund in Beziehung

gesetzt, wobei den Dialyse- und in vitro-Verteilungsversuchen mit Pferdeblut ein besonderes Gewicht zukommt, da sie an derselben Species gemacht wurden. Entsprechend den verschiedenen Adsorptions- und Sättigungstendenzen gegenüber Plasma- und Erythrocyteneiweiß zeigen die untersuchten Verbindungen im Blut differente Verteilungen. Tab. 2 enthält die in vitro-Verteilungsversuche mit III bei Pferd und Hund. (Bezüglich I und II vgl. Mitt. II.)

Das stark dissoziierte I dringt nur schwer in die Erythrocyten ein und ist bei der geringfügigen Plasmaeiweißadsorption vorwiegend im Plasmawasser anzutreffen. Das elektrisch neutrale II tritt in größeren Mengen in den Erythrocyten auf und wird auch etwas an Plasmaeiweiß gebunden. III tritt trotz seines hohen Dissoziationsgrades gut in die Erythrocyten ein, was auf seine gute Lipoidlöslichkeit und große Oberflächenaktivität zurückgeführt werden muß. Es wird besonders stark an das Plasmaeiweiß gebunden.

Tabelle 3. *Die Verteilung von Sulfaäthylthiodiazol beim nierenlosen Hund nach i.v.-Verabreichung von 100 mg/kg (mg-%).*
(In Klammern Zahl der Versuche.)

| Zeit in min → | 5 | | 20 | | 50 | | 120 | | 180 | | 240 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | m | ε | m | ε | m | ε | m | ε | m | ε | m | ε |
| Blut | 33,2 (6) | ± 0,7 | 24,2 (6) | ± 0,4 | 21,3 (6) | ± 0,6 | 18,8 (5) | ± 0,8 | 17,2 (4) | ± 1,2 | 16,1 (3) | ± 1,7 |
| Plasma | 40,2 (6) | ± 1,4 | 31,6 (6) | ± 1,66 | 28,6 (6) | ± 1,4 | 26,2 (5) | ± 1,39 | 23,5 (4) | ± 1,1 | 23,0 (3) | ± 1,5 |
| Ultra-Filtrat | 14,6 (6) | ± 0,5 | 10,0 (6) | ± 0,8 | 8,7 (6) | ± 0,8 | 7,7 (5) | ± 0,5 | 7,9 (4) | ± 0,7 | 7,2 (3) | ± 0,6 |
| Liquor | | | 0,53 (5) | ± 0,06 | 0,76 (5) | ± 0,13 | 1,1 (4) | ± 0,09 | 1,27 (3) | ± 0,01 | 1,6 (3) | ± 0,03 |
| Kammerwasser | | | 1,38 (4) | ± 0,3 | 1,55 (5) | ± 0,22 | 1,44 (2) | ± 0,72 | 0,8 (1) | | | |
| Perikard | | | | | 13,5 (1) | | 14,8 (1) | | 8,2 (1) | | 14,2 (3) | ± 0,5 |
| Vert. Vol-% | | | | | 34,7 | ± 0,9 | | | | | | |
| Körp. Gew. | | | | | | | | | | | | |

Wenn man aus der Ultrafiltrat- und Plasmakonzentration unter Berücksichtigung des jeweiligen Plasmaeiweißgehaltes die pro 1 g Eiweiß gebundene Menge bestimmt und den Gleichgewichtskonzentrationen im Blutwasser gegenüberstellt, erhält man für II und III sehr ähnlich verlaufende Kurven wie bei der Dialyse (Abb. 1).

Abgesehen von gewissen quantitativen Unterschieden, zeigt die Verteilung von I, II und III im Pferde- und Hundeblut dieselben Tendenzen, so daß die Ergebnisse der Dialyseversuche bei der Besprechung der in vivo-Verteilung am nierenlosen Hund wohl verwertet werden können. (Hinsichtlich I und II vgl. Mitt. II.) Die Verteilung von III ist aus Tab. 3 zu ersehen.

Nach 50 min ist Verteilungsgleichgewicht erreicht mit einem Volumen von 34,7%. Die Konzentration im Liquor beträgt um diese Zeit $^1/_{30}$, im Kammerwasser $^1/_{15}$ und in der Perikardflüssigkeit $^2/_3$ der Blutkonzentration.

Tabelle 4. *Beziehungen der Konzentrationen in Liquor, Kammerwasser und Perikardflüssigkeit zu Blut-, Plasma- und Blutwasserkonzentration.*

| | nach Minuten | Liquor | Kammerwasser | Perikard | Perikard | Liquor | Kammerwasser | Perikard |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Blut | | | Plasma | Blutwasser | | |
| Sulfaäthylthiodiazol | 20 | | | | | 0,05 | 0,14 | |
| | 50 | 0,03 | 0,07 | ca. 0,6 | | 0,09 | 0,18 | |
| | 120 | 0,05 | 0,07 | ca. 0,8 | | 0,14 | 0,23 | |
| | 180 | | | | | 0,17 | | |
| | 240 | | | | 0,61 | 0,22 | | 2,01 |
| Sulfanilamid | 20 | | | | | 0,25 | 0,52 | |
| | 50 | 0,33 | ca. 0,5 | 0,6 | | 0,57 | 0,82 | |
| | 120 | 0,6 | 0,6 | ca. 0,8 | | 0,91 | 0,92 | |
| | 180 | | | | | 1,01 | | |
| | 240 | | | | 0,72 | 1,06 | | 1,25 |
| Sulfanilsäure | 20 | | | | | 0,01 | 0,05 | |
| | 50 | 0,027 | 0,1 | | | 0,03 | 0,10 | |
| | 120 | 0,05 | 0,11 | 0,6 | | 0,05 | 0,10 | |
| | 180 | | | | | 0,06 | | |
| | 240 | | | | 0,59 | 0,08 | | 0,62 |

Die Verteilungsvolumina für I, II und III betragen 28,2, 67,6 und 34,7% Körpergewicht. Es ist also bei den an Plasmaeiweiß gut adsorbierbaren Verbindungen das größere Verteilungsvolumen erreicht worden, so daß diese Adsorptionsvorgänge dem Eindringen in die Gewebe keinen Widerstand entgegensetzen. Es sieht so aus, als ob die an das Plasmaeiweiß adsorbierbaren Substanzen auch eine größere Affinität zu anderen

Eiweißkörpern hätten, die für das Verteilungsvolumen bestimmend ist. Die Erythrocyteneiweißaffinität läuft parallel mit der Größe des Verteilungsvolumens; somit erscheinen die Erythrocyten als geeignetes Modell für das Verhalten der Gewebszelle bei II u. III.

Zum Vergleich der Verteilungsvorgänge bei I, II und III ist in der Tab. 4 das Verhältnis der im Verteilungsgleichgewicht erreichten Konzentrationen in Liquor, Kammerwasser und Perikard zu den Blut- bzw. Ultrafiltratkonzentrationen zusammengestellt.

II dringt in Subarachnoidalraum und Vorderkammer am leichtesten ein, III und I erreichen nur sehr geringe Konzentrationen. Ihr Eindringen in die Vorderkammer ist gegenüber Subarachnoidalraum zwar beschleunigt, aber immer noch sehr schwach, im Perikardraum erreichen beide beachtliche Konzentrationen.

Es ist anzunehmen, daß es sich beim Übertritt in die untersuchten Räume um einen durch die spezifische Capillarpermeabilität modifizierten Diffusionsvorgang handelt, für dessen Geschwindigkeit im wesentlichen die Konzentration im Blutwasser maßgebend ist. Auf die Verminderung der Blutwasserkonzentration durch eine starke Adsorption an Plasma- bzw. Erythrocyteneiweiß wurde bereits hingewiesen. Für die Überlegung, ob die Eindringungsgeschwindigkeit durch Adsorptionsvorgänge an das Eiweiß in den Flüssigkeiten wesentlich mitbestimmt wird, werden im folgenden die Ultrafiltratkonzentrationen als Bezugsgröße gewählt.

II erscheint im Subarachnoidalraum nach 180 min in Blutwasserkonzentration, hingegen setzt die Blutliquorschranke dem Eindringen der dissoziierten Verbindungen I und III eine außerordentlich starke Sperrwirkung entgegen. Der Eiweißgehalt des normalen Liquors ist sehr gering. Aus den Dialyseversuchen ergibt sich, daß solche niedrigen Eiweißkonzentrationen den Diffusionsvorgang nur ganz unbedeutend fördern können. Es lassen sich auch zwischen Liquorkonzentration des am stärksten adsorbierbaren III und den zugehörigen Liquoreiweißkonzentrationen keine klaren Beziehungen erkennen. Beim Übertritt in den Subarachnoidalraum wird der Dialysevorgang bei den elektrisch geladenen Stoffen durch eine Membran behindert. Bei den nichtgeladenen ist diese Behinderung unbedeutend. Daneben kann eine mangelnde Konvektion und lange Diffusionswege mitbeteiligt sein, während das Liquoreiweiß im gesunden Organismus keine Rolle spielt.

Sehr ähnlich liegen die Verhältnisse in der Augenvorderkammer. II erreicht nach 120 min fast Blutwasserkonzentration, III $^1/_4$, I $^1/_{10}$ derselben. Die Verzögerung des Eintrittes ist hier nicht ganz so stark wie im Subarachnoidalraum, offenbar wegen der Kürze der

Diffusionswege. Hinsichtlich der Adsorption an das Kammerwassereiweiß als fördernder Faktor der Permeation gilt dasselbe wie beim Liquor.

Die Perikardflüssigkeit mit ihrem höheren Eiweißgehalt ist als Transsudat aufzufassen und man muß hier einen größeren Einfluß der Eiweißadsorption erwarten. III erreicht im Perikardraum die höchste Konzentration gegenüber dem Blutwasser, offenbar wegen des höheren Eiweißgehaltes. I erreicht niemals Blutwasserkonzentration. Zum Vergleich mit den Dialyseversuchen wurden die Mehrwerte der Plasmakonzentration in Prozenten der Perikardkonzentration berechnet. Sie betragen unter Verwertung der drei nach 240 min gewonnenen Periardkonzentrationen 57—68%. Das Endgleichgewicht der entsprechenden Dialyseversuche (8% Eiweiß innen, 2% außen, 20 mg-% III) zeigte in der 8%igen Eiweißlösung einen Mehrwert von 67,6%. Auf Grund der guten Übereinstimmung der beiden Versuchsserien kann man wohl sagen, daß auch in vivo die Konzentrationseinstellung im Perikard von dem Eiweißkonzentrationsverhältnis Plasma-Perikardflüssigkeit bestimmt wird. Die entsprechenden Mehrwerte im Plasma in vivo liegen nach 50, 120 und 180 min mit 125, 107 und 185% weit höher. Das Gleichgewicht ist hier noch nicht erreicht, obwohl die Austauschfläche der Capillaren im Perikard viel größer ist als die Oberfläche der Dialysenmembran. Offenbar ist auch hier die Diffusion etwas gehemmt, aber viel geringer als im Subarachnoidalraum und in der Vorderkammer. Bei I ist die Hemmung viel stärker und bei III übertrifft die Förderung der Diffusion durch die Adsorption an das Perikardeiweiß den hemmenden Einfluß der elektrischen Ladung. Im Perikardraum wird die Konzentration der adsorbierten Stoffe durch das Verhältnis Plasma-Pericardeiweiß mitbestimmt. Für die nichteiweißgebundenen Stoffe sind die Konzentrationen im Blutwasser und der Membranwiderstand maßgebend.

Es läßt sich demnach unter den gewählten Versuchsbedingungen für die Verteilung im Perikardraum eine Analogie zu den Dialysemodellversuchen mit Plasmaeiweiß auffinden, womit bestätigt wird, daß bei der Verteilung im Organismus Adsorptionsvorgänge an Gewebseiweiß einen sehr wesentlichen Faktor darstellen.

## Zusammenfassung.

Es wurde in Dialysemodellversuchen mit Sulfanilsäure (I), Sulfanilamid (II) und Sulfaäthylthiodiazol (III) unter Bedingungen, die die Verhältnisse bei der in vivo-Verteilung hinsichtlich Eiweißgehalt in Blut, Liquor, Kammerwasser und Perikardflüssigkeit nachahmen, geprüft, wie sich zwei durch eine Membran getrennte, gleichkonzentrierte Lösungen mit verschiedenem Eiweißgehalt verhalten. III diffundiert

stärker als II in Richtung der höheren Eiweißkonzentration. I zeigte eine geringfügige Konzentrationsverschiebung zugunsten der eiweißfreien Lösung, was im Gegensatz zu der in vitro-Verteilung steht. Die Ergebnisse der Dialyseversuche wurden in Beziehung gesetzt zu den Verteilungsbefunden von I, II und III an den Blutphasen und beim nierenlosen Hund. Die Versuche unterstützen die Annahme, daß bei der Verteilung im Organismus Adsorptionsvorgänge an Gewebseiweiß einen sehr wesentlichen Faktor darstellen.

## Literatur.

Michaelis, L., u. P. Rona: Biol. Z. **14**, 476 (1908).

Prof. Dr. H. Langecker, Berlin N. 65, Müllerstr. 170/172.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 46—61 (1955).

Aus dem Toxikologischen und Gewerbehygienischen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG, W.-Elberfeld.

# Über den Mechanismus der Kollidonausscheidung der Niere.

Von

G. Hecht.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 20. März 1955.)*

Als „Kollidon" bezeichnen wir den von Reppe synthetisierten kolloiden Bestandteil des Blutersatzmittels „Periston" (Hecht u. Weese), das Polyvinylpyrrolidon (PVP). Sein Schicksal im Organismus ist von großer praktischer Bedeutung, sein Verweilen im zirkulierenden Blut ist der entscheidende Faktor für die Dauer der Kreislaufauffüllung; die spätere Elimination und das Zurückbleiben von Resten spielen eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Verträglichkeit.

Das Organ, das die Kollidonausscheidung bewerkstelligt, ist die Niere. Eine Ausscheidung durch die Galle oder seitens der Darmwand spielt daneben quantitativ keine Rolle und ist auch mit chemischen Methoden bisher nicht faßbar gewesen; erst bei Untersuchung mit radioaktiv markiertem Kollidon fanden sich Hinweise dafür, daß auch durch diese Organe eine spurenhafte Ausscheidung stattfindet (Steele u. Mitarb., Ravin u. Mitarb., Weese). Einem fermentativen Abbau im Intermediärstoffwechsel unterliegt das Kollidon offenbar nicht (Ammon, Ammon u. Braunschmidt), es erscheint im Harn in chemisch unverändertem Zustande.

Bereits bei der Einführung des Peristons war bekannt geworden, daß ein gewisser Anteil des Kollidons den Organismus rasch wieder durch die Niere verläßt. Ammon u. Braunschmidt haben als erste die Auffassung veröffentlicht, daß „die ersten 40—60% des injizierten Peristons, die den Organismus durch die Niere verlassen, die niedrigmolekularen Anteile sind, während die höhermolekularen Teilchen die Niere nicht passieren und vornehmlich in Milz und Lymphknoten abgelagert werden". Dieselbe Vorstellung wurde bald darauf auch von Schubert ausführlich erörtert, der bei Patienten den Befund erhob, daß ein niedermolekulares Kollidon (Periston N) wesentlich schneller im Harn wiedererschien als das für Blutersatzzwecke im Handel befindliche Periston, und zwar zu 71—97% der verabreichten Menge. Ein tierexperimenteller Nachweis des verschiedenartigen Verhaltens von Kollidonen verschiedener Molekulargrößen wurde dann von Weese erbracht. Nach seinen Untersuchungen fanden sich im Kaninchenharn nach intravenöser Gabe von etwa 1 g/kg in 24 Std folgende Kollidonmengen wieder (Tab. 1).

An dieser Stelle möchten wir einen bisher nicht veröffentlichten Versuch unseres Laboratoriums einfügen, der das Verhalten des Blutspiegels und der Harnausscheidung eines unfraktionierten Kollidons und

dreier daraus mittels Acetonfällung gewonnener Fraktionen veranschaulicht. Die Versuche wurden an Kaninchen durchgeführt, die 0,85 g/kg intravenös erhielten. (Kollidonbestimmung nach ZIPF.) Tab. 2.

Nach solchen Beobachtungen war es nicht mehr zu bezweifeln, daß die Niere bei der Kollidonausscheidung eine Auswahl nach der Molekülgröße trifft. Aber es liegen auch direkte Beweise für dies Ergebnis vor,

*Tabelle 1.*

| Mittleres Molekulargewicht | Streuung | Ausscheidung im Harn % |
|---|---|---|
| 25000 | 5000—40000 | 80—95 |
| 40000 | 5000—65000 | 46—76 |
| 50000 | 10000—80000 | 37—50 |
| 140000 | 100000—1 Mill. | 0 |

die durch Untersuchung der Molekulargewichtsverteilung des im Harn wiedererscheinenden Kollidons und deren Vergleich mit den Eigenschaften des verabreichten Kollidons gewonnen sind. Hierzu können wir ebenfalls einige bislang nicht veröffentlichte Beobachtungen unseres Laboratoriums mitteilen.

Bei jeweils 3 Kaninchen wurden insgesamt 8 g Kollidon i.v. verabreicht und das Kollidon aus der Gesamtharnmenge, die diese 3 Tiere in 24 Std produzierten, isoliert und fraktioniert. Dazu wurde es zunächst

*Tabelle 2.*

| Kollidon | Kaninchen Nr. | % der Dosis im 24 Std-Harn | Im Blut mg % nach | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 24 Std | 48 Std | 72 Std |
| Unfraktioniert | 1 | 40 | — | 294 | 259 |
| | 2 | 67 | 292 | 224 | 126 |
| | 3 | 45 | 371 | | |
| Hochmolekulare Fraktion | 4 | 26 | 579 | 455 | 406 |
| (65000) | 5 | 24 | 742 | 488 | 441 |
| Mittlere Fraktion | 6 | 48 | 257 | 222 | 163 |
| (32000) | 7 | 49 | 383 | 308 | 198 |
| Niedermolekulare Fraktion | 8 | 72 | 50 | 42 | 41 |
| (8400) | 9 | 63 | 30 | 30 | 30 |

aus dem Harn nach ZIPF mit Trichloressigsäure ausgefällt, dann mit Methanol eluiert, das Methanol verdampft und der Rückstand getrocknet. Das Kollidon wurde dann wieder in Wasser gelöst und durch stufenweisen Acetonzusatz in 3 Fraktionen zerlegt. Diese wurden wieder mehrere Stunden bei 105° getrocknet, dann die Viscositäten 1%iger wäßriger Lösungen bei 25° im OSWALD-Viscosimeter gemessen und

danach nach Scholtan (1952) das Molekulargewicht ermittelt. Die Tab. 3 zeigt die so erhaltenen Befunde.

In weiteren Versuchen wurde durch bedeutende Vermehrung der einzelnen Fällungsfraktionen die Molekulargewichtsverteilung des Kolli-

*Tabelle 3.*

| | Kollidon | |
|---|---|---|
| | K 26,2 | K 30 |
| 24 Std-Ausscheid. in % d. Dos. | 62 | 32 |
| Davon: Niedermolek. Fraktion | 12,4%: M.-G. 5200 | 14,7%: M.-G. 5000 |
| Mittlere Fraktion . . . . . | 63,0%: M.-G. 26000 | 70,6%: M.-G. 18000 |
| Hochmolekulare Fraktion . . | 23,3%: M.-G. 42000 | 14,7%: M.-G. 60000 |

dons im Periston und im Harn damit behandelter Patienten verfolgt. Das Ergebnis einer solchen Beobachtung stellt die Abb. 1 dar.

Ähnliche Untersuchungen wurden von Cannan u. Mitarb. durchgeführt. Ravin u. Mitarb. nehmen nach ihren bereits erwähnten Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Kollidon an, daß solches mit einem Molekulargewicht unter 25000

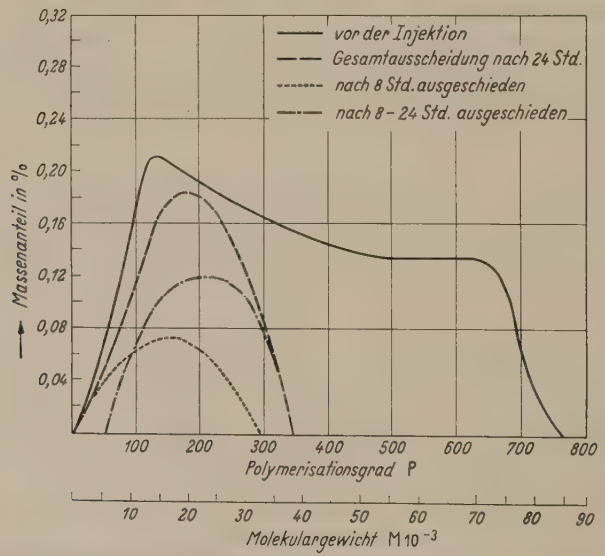



Abb. 1. Molekulargewichtsverteilung des injizierten und vom Menschen ausgeschiedenen Kollidon.

schnell den Glomerulus passiert, daß aber auch Fraktionen bis zum Molekulargewicht von 40000 in wenigen Tagen vollständig durch die Niere ausgeschieden werden. Campbel u. Mitarb. kamen dagegen zu der Schlußfolgerung, daß Kollidon bis zu einem Molekulargewicht von 100000 noch vollständig, wenn auch erst im Verlauf von Wochen, durch die Nieren eliminiert wird.

Die vorliegenden Untersuchungen sind in der Absicht unternommen worden, das Verhalten des Kollidons bei der Ausscheidung durch die Niere näher kennenzulernen. Unsere Fragestellung war insbesondere, ob sich für kleine Kollidonmoleküle eine leichte Passage des Glomerulusfilters nachweisen läßt, die mit derjenigen des Inulins oder anderer niedermolekularer Kolloide vergleichbar ist, und weiterhin, wann bei zunehmendem Molekulargewicht eine meßbare Verzögerung der Glomeruluspassage einsetzt. Das bedeutet, daß wir die Clearance-Werte verschiedener Kollidonfraktionen zu untersuchen und mit denjenigen von Kreatinin oder Inulin zu vergleichen hatten.

Bei unseren ersten Versuchen in dieser Richtung mußten wir feststellen, daß zur Erzielung einwandfreier Ergebnisse zwei Voraussetzungen zu beachten waren. Die Versuche waren nur mit möglichst eng begrenzten Fraktionen von Kollidon durchführbar und erforderten zudem eine möglichste Konstanthaltung des Kollidonblutspiegels. Das Kollidon, so wie es technisch hergestellt und für Blutersatzzwecke verwendet wird, ist nicht „polymereinheitlich", sondern enthält Moleküle, deren Größe eine mehr oder weniger breite Streuung um einen Mittelwert aufweist (Näheres siehe bei Reppe).

Verabreicht man eine Einzeldosis eines solchen technischen Polymerisates, so macht sich die oben bereits erörterte, nach der Molekülgröße auswählende Nierenausscheidung auch schon während relativ kurzer Versuchszeiten bemerkbar. Es kommt anfänglich zu einer schnellen Ausscheidung der niedermolekularen Fraktionen mit für sie charakteristischen hohen Clearance-Werten. Je kleiner deren Anteil am Kollidonbestand des Blutes aber wird, um so mehr fällt die Clearance auf die kleinen Werte, die den höhermolekularen Anteilen zukommen.

## Methoden.

Die verwendeten Kollidonpräparate wurden durch Acetonfraktionierung aus einem technischen Polyvinylpyrrolidon gewonnen. Ihre Molekulargewichte wurden aus der bei 25° gemessenen Viscosität 1%iger wäßriger Lösungen nach der von Scholtan (1952) ermittelten Beziehung

$$\overline{Mw} = 50 \cdot K^{2,3}$$

berechnet.

Bei den beiden niedermolekularen Kollidonfraktionen wurden ferner zur Kontrolle die Diffusionskonstanten DA bestimmt und nach der von Scholtan angegebenen Gleichung

$$M = \frac{1 \cdot 10^{-8}}{D^2}$$

das Molekulargewicht berechnet. Die Gültigkeit beider Formeln ist experimentell im Bereich von 10000—100000 gesichert, kleinere Molekulargewichte können nach dieser Formel nur näherungsweise bestimmt werden.

Für die Molekulargewichte der verwendeten Präparate ergeben sich dann die in der Tab. 4 zusammengestellten Werte.

Die Tierversuche wurden an Hunden und zum Teil auch an Katzen durchgeführt. Die am Versuchstage nüchternen Tiere erhielten zunächst mittels Schlundsonde 100—300 cm³ Wasser. Sie wurden dann mittels 50 mg/kg Chloralose i.v. und 20 mg/kg Phanodorm-Natr. i.p. narkotisiert. Bei Bedarf wurde im Laufe des Versuchs Phanodorm-Natr. i.v. nachgegeben.

Die Nierenfiltratmenge wurde meist mit Kreatinin, in einem großen Teil der Versuche jedoch mit Inulin und gelegentlich mit beiden Testsubstanzen gleichzeitig ermittelt. Kollidon, Kreatinin bzw. Inulin wurden in stets gleichen Teildosen während des ganzen Versuchs in Abständen von jeweils 15 min intravenös

*Tabelle 4.*

| Präparat | K | M | DA · $10^7$ cm²/sec | M | $\overline{M}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 12,06 | 4600 | 14,7 | 4630 | $\sim$ 4600 |
| II | 18,70 | 12600 | 9,32 | 11500 | $\sim$ 12000 |
| III | 20,93 | 16400 | | | |
| IV | 27,47 | 30000 | | | |

verabreicht. Dadurch wurde ein konstanter Blutspiegel angestrebt, allerdings nicht immer erreicht. Die je Stunde verabreichten Dosen der einzelnen Präparate betrugen für Kollidon 50 mg/kg, für Kreatinin 25 mg/kg und für Inulin 250 mg/kg.

Die Harnportionen wurden in stündlichen Abständen gesammelt und durch Blasenspülung mit jeweils 10 cm³ Wasser zeitlich genau abgegrenzt. Gleichzeitig mit der Harnprobe wurde jeweils eine Blutprobe aus der Art. carot. entnommen.

Die Kollidonbestimmung wurde im Serum nach Poullain u. Piette, im Urin nach Levy u. Fergus vorgenommen. Dabei wurden die photometrischen Eichkurven mit der jeweiligen Kollidonfraktion besonders ermittelt (Pulfrich-Photometer mit photoelektrischer Ausrüstung, Filter S 50). Das (endogene + exogene) Kreatinin wurde nach Schoch u. Cámara bestimmt, Inulin nach Menne u. Mitarb.

Bei Hunden wird durch größere Einzeldosen von Kollidon oft ein schockartiger Zustand ausgelöst. Um dies auszuschalten, haben wir Hunden etwa 1 Std vor Versuchsbeginn eine Einzeldosis von ungefähr 2 mg/kg zwecks Desensibilisierung verabreicht.

## Versuchsergebnisse.

Die wichtigsten Daten der in unseren Versuchen an 15 Hunden und 6 Katzen mit insgesamt 110 auswertbaren Versuchsperioden gemachten Beobachtungen haben wir in den Tab. 5—8 niedergelegt.

Die Kollidonkonzentration im Serum (Spalte 3) schwankte bei jedem Versuchstier zeitlich in gewissen Grenzen, in stärkerem Maße aber auch für die gleiche Kollidonfraktion von Tier zu Tier. Für die Kollidone III und IV kam es im Durchschnitt auch zu einer recht erheblichen Zunahme des Blutspiegels während der Versuchsdauer, die Elimination des Kolloids aus der Blutbahn hielt hier nicht mit der Zufuhr von 50 mg/kg/Std Schritt.

In Spalte 4 ist angegeben, welchen Anteil die Ausscheidung im Harn in Prozent der Zufuhr darstellt. Im Mittel beträgt dieser Anteil bei Hunden für Kollidon I 91 $\pm$ 2% und für Kollidon II 95 $\pm$ 2,2% und weicht nicht sicher von einer vollständigen Wiederausscheidung dieser

Tabelle 5. *Kollidon I.*

| Versuch | Std | Kollidon im | | Clearance | | | Kollidon-Clearance in % der | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Serum mg % | Harn % der Dosis | Kollidon | Kreatinin | Inulin | Kreatinin-Clearance | Inulin-Clearance |
| | | | | cm³/min/m² | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1. 2. 8. 1954 | 1 | 26 | 103 | 74 | 93 | — | 80 | — |
| Hund 6,8 kg | 2 | 27 | 97 | 62 | 94 | | 66 | |
| | 3 | 24 | 95 | 63 | 101 | | 62 | |
| | 4 | 26 | 99 | 68 | 102 | | 67 | |
| | 5 | 28 | 91 | 57 | 103 | | 56 | |
| | 6 | 29 | 105 | 62 | 112 | | 55 | |
| 2. 5. 8. 1954 | 1 | 19 | 77 | 71 | 96 | — | 74 | — |
| Hund 6,3 kg | 2 | 18 | 92 | 83 | 112 | | 74 | |
| | 3 | 19 | 80 | 72 | 112 | | 64 | |
| | 4 | 23 | 81 | 60 | 102 | | 59 | |
| | 5 | 23 | 90 | 65 | 119 | | 55 | |
| 3. 8. 8. 1954 | 1 | 25 | 91 | 71 | 96 | — | 74 | — |
| Hund 7,5 kg | 2 | 30 | 99 | 63 | 100 | | 63 | |
| | 3 | 32 | 85 | 48 | 96 | | 50 | |
| | 4 | 36 | 92 | 47 | 104 | | 46 | |
| | 5 | 35 | 101 | 50 | 102 | | 49 | |
| | 6 | 40 | 91 | 43 | 114 | | 37 | |
| 4. 12. 8. 1954 | 1 | 18 | 84 | 82 | 80 | — | 103 | — |
| Hund 6,4 kg | 2 | 17 | 90 | 86 | 73 | | 118 | |
| | 3 | 18 | 92 | 88 | 87 | | 102 | |
| | 4 | 22 | 70 | 59 | 19 | | 75 | |
| | 5 | 26 | 87 | 62 | 79 | | 79 | |
| | 6 | 24 | 82 | 57 | 88 | | 64 | |
| 5. 16. 8. 1954 | 1 | 20 | 90 | 75 | 97 | — | 77 | — |
| Hund 6,4 kg | 2 | 22 | 90 | 71 | 96 | | 74 | |
| | 3 | 25 | 72 | 51 | 86 | | 60 | |
| | 4 | 25 | 90 | 60 | 106 | | 57 | |
| | 5 | 23 | 87 | 61 | 86 | | 70 | |
| | 6 | 24 | 91 | 64 | 100 | | 65 | |
| 6. 22. 9. 1954 | 1 | 32 | 119 | 91 | — | 115 | — | 79 |
| Hund 15,4 kg | 2 | 31 | 109 | 77 | | 124 | | 62 |
| | 3 | 30 | 87 | 64 | | 121 | | 53 |
| | 4 | 31 | 91 | 66 | | 125 | | 53 |
| | 5 | 32 | 87 | 62 | | 139 | | 44 |
| | 6 | 32 | 91 | 64 | | 148 | | 43 |
| 7. 29. 9. 1954 | 1 | 47 | 88 | 34 | — | 54 | — | 63 |
| Hund 9,0 kg | 2 | 52 | 66 | 23 | | 37 | | 63 |
| | 3 | 54 | 18 | 27 | | 50 | | 55 |
| | 4 | 54 | 123 | 42 | | 72 | | 59 |
| | 5 | 67 | 91 | 28 | | 54 | | 52 |
| | 6 | 70 | 97 | 26 | | 60 | | 44 |

*Tabelle 5.* (Fortsetzung.)

| Versuch | Std | Kollidon im | | Clearance | | | Kollidon-Clearance in % der | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Serum mg % | Harn % der Dosis | Kollidon | Kreatinin | Inulin | Kreatinin Clearance | Inulin-Clearance |
| | | | | cm³/min/m² | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 8. 3. 11. 1954 | 1 | 41 | 75 | 28 | 42 | — | 67 | — |
| Katze 3,1 kg | 2 | 50 | 77 | 22 | 36 | | 62 | |
| | 3 | 60 | 79 | 19 | 31 | | 60 | |
| | 4 | 102 | 75 | 12 | 25 | | 48 | |
| | 5 | 86 | 61 | 9 | 18 | | 47 | |
| 9. 28. 10. 1954 | 1 | 33 | 58 | 16 | — | 30 | — | 53 |
| Katze 2,6 kg | 2 | 39 | 64 | 22 | | 53 | | 41 |
| | 3 | 29 | 72 | 26 | | 72 | | 36 |
| | 4 | 76 | 59 | 14 | | 31 | | 44 |
| | 5 | 49 | 87 | 17 | | 53 | | 33 |

Fraktionen bei der gewählten Größe der Zufuhr ab, wohl aber für Kollidon III mit 80 $\pm$ 1,6% und Kollidon IV mit 67 $\pm$ 6%. Bei Katzen sind die entsprechenden Mittel für Kollidon I 71 $\pm$ 3,2, für Kollidon II 82 $\pm$ 5 und für Kollidon III 78 $\pm$ 5%.

Um die an Tieren verschiedener Größe gefundenen Clearance-Werte untereinander besser vergleichbar zu machen, haben wir sie in den obigen Tabellen nach Reduktion auf die Körperoberfläche ($O = 0{,}093\ G^{2/3}\ m^2$, $G$ = Gewicht des Tieres in Kilogramm) angegeben. Die Mittelwerte aus allen gefundenen reduzierten Plasma-Clearance-Werten sind mit ihren Schwankungsbreiten in der Tab. 9 zusammengestellt.

Darin sind die einzelnen 1stündigen Versuchsperioden, deren Gesamtzahl jeweils angegeben ist, ohne Rücksicht darauf kombiniert, wieviele davon jeweils von einem Versuchstier stammen, infolgedessen sind die Schwankungen wesentlich erheblicher als diejenigen zwischen den einzelnen Beobachtungsperioden an ein- und demselben Tier.

Die Tab. 5—8 enthalten schließlich die für jede einzelne Beobachtungsperiode errechneten relativen Kollidon-Clearance-Werte, d. h. den Kollidon-Clearance-Wert in Prozent des Clearance-Wertes der jeweiligen Filtrat-Testsubstanz Kreatinin bzw. Inulin. Die aus ihnen gebildeten Mittelwerte enthält die Tab. 10.

Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse ist ferner zu berücksichtigen, daß die Werte für die relative Kollidon-Clearance im Verlauf der mehrstündigen Beobachtungen am einzelnen Tier einen wenigstens bei den Kollidonen I und II auffälligen Abfall aufweisen. Werden sie stundenweise zusammengefaßt, so ergeben sich die in Tab. 11 aufgeführten Mittelwerte.

Tabelle 6. *Kollidon II.*

| Versuch | Std | Kollidon im | | Clearance | | | Kollidon-Clearance in % der | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Serum mg % | Harn % der Dosis | Kollidon | Kreatinin | Inulin | Kreatinin-Clearance | Inulin-Clearance |
| | | | | cm³/min/m² | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 10. 15. 7. 1954 | 1 | 28 | 105 | 78 | 105 | — | 75 | — |
| Hund 16,3 kg | 2 | 27 | 93 | 74 | 93 | | 80 | |
| | 3 | 27 | 87 | 80 | 141 | | 57 | |
| | 4 | 23 | 90 | 83 | 135 | | 62 | |
| 11. 20. 7. 1954 | 1 | 44 | 88 | 35 | 85 | — | 41 | — |
| Hund 8,0 kg | 2 | 40 | 91 | 39 | 80 | | 49 | |
| | 3 | 42 | 107 | 47 | 115 | | 41 | |
| | 4 | 53 | 100 | 38 | 86 | | 44 | |
| 12. 26. 7. 1954 | 1 | 21 | 98 | 78 | 104 | — | 75 | — |
| Hund 6,5 kg | 2 | 26 | 108 | 77 | 99 | | 78 | |
| | 3 | 37 | 111 | 64 | 88 | | 65 | |
| | 4 | 30 | 107 | 67 | 121 | | 56 | |
| | 5 | 25 | 103 | 65 | 124 | | 52 | |
| 13. 25. 11. 1954 | 1 | 82 | 74 | 16 | 14 | 16 | 114 | 100 |
| Hund 10,5 kg | 2 | 92 | 83 | 19 | 18 | 22 | 106 | 84 |
| | 3 | 90 | 104 | 22 | 25 | 27 | 89 | 82 |
| | 4 | 87 | 106 | 24 | 28 | 28 | 85 | 84 |
| | 5 | 80 | 104 | 24 | 33 | 35 | 74 | 70 |
| 14. 6. 12. 1954 | 1 | 27 | 79 | 56 | 73 | 69 | 77 | 81 |
| Hund 8,7 kg | 2 | 30 | 87 | 56 | 85 | 115 | 66 | 49 |
| | 3 | 35 | 89 | 50 | 89 | 109 | 56 | 46 |
| | 4 | 34 | 87 | 46 | 91 | 104 | 51 | 44 |
| | 5 | 36 | 86 | 45 | 93 | 103 | 48 | 44 |
| 15. 18. 10. 1954 | 1 | 41 | 42 | 11 | 16 | — | 66 | — |
| Katze 2,55 kg | 2 | 42 | 73 | 20 | 31 | | 66 | |
| | 3 | 105 | 71 | 11 | 15 | | 76 | |
| 16. 9. 11. 1954 | 1 | 67 | 77 | 20 | 48 | — | 42 | — |
| Katze 3,2 kg | 2 | 72 | 71 | 14 | 31 | | 44 | |
| | 3 | 76 | 79 | 14 | 32 | | 44 | |
| | 4 | 92 | 88 | 14 | 34 | | 40 | |
| | 5 | 96 | 81 | 11 | 25 | | 46 | |
| 17. 25. 10. 1954 | 1 | 40 | 95 | 34 | — | 64 | — | 54 |
| Katze 2,9 kg | 2 | 40 | 96 | 31 | | 69 | | 45 |
| | 3 | 40 | 98 | 31 | | 80 | | 39 |
| | 4 | 37 | 96 | 32 | | 80 | | 40 |
| | 5 | 42 | 93 | 30 | | 76 | | 40 |

## Erörterung der Befunde.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die von uns angestrebte Konstanz des Kollidon-Serumspiegels im Laufe der Versuche durchaus nicht immer erreicht wurde. Für die Kollidone I und II traten während

eines Versuches an einem bestimmten Tier nur unregelmäßige Schwankungen auf, die im ganzen nur eine unbedeutende Tendenz zur Zunahme aufwiesen. Das steht in einem sehr einleuchtenden Zusammenhang mit

Tabelle 7. *Kollidon III.*

| Versuch | Std | Kollidon im | | Clearance | | | Kollidon-Clearance in % der | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Serum mg % | Harn % der Dosis | Kollidon | Kreatinin | Inulin | Kreatinin-Clearance | Inulin-Clearance |
| | | | | cm³/min/m² | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 18. 5. 10. 1954 | 1 | 40 | 72 | 44 | — | 242 | — | 18 |
| Hund 13,0 kg | 2 | 52 | 81 | 36 | | 256 | | 14 |
| | 3 | 57 | 84 | 33 | | 236 | | 14 |
| | 4 | 79 | 80 | 25 | | 131 | | 19 |
| | 5 | 70 | 81 | 23 | | 148 | | 16 |
| | 6 | 74 | 80 | 23 | | 229 | | 10 |
| 19. 11. 10. 1954 | 1 | 70 | 74 | 20 | 72 | — | 28 | — |
| Hund 7,2 kg | 2 | 82 | 77 | 18 | 70 | | 25 | |
| | 3 | 99 | 76 | 15 | 62 | | 23 | |
| | 4 | 104 | 82 | 14 | 61 | | 23 | |
| | 5 | 112 | 84 | 14 | 62 | | 22 | |
| | 6 | 123 | 84 | 12 | 59 | | 21 | |
| 20. 14. 10. 1954 | 1 | 87 | 59 | 10 | — | 52 | — | 19 |
| Katze 2,7 kg | 2 | 111 | 87 | 11 | | 57 | | 19 |
| | 3 | 149 | 72 | 7 | | 25 | | 28 |
| | 4 | 159 | 87 | 7 | | 20 | | 36 |
| | 5 | 168 | 85 | 7 | | 24 | | 27 |
| | 6 | 156 | 77 | 6 | | 33 | | 18 |

Tabelle 8. *Kollidon IV.*

| Versuch | Std | Kollidon im | | Clearance | | | Kollidon-Clearance in % der | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Serum mg % | Harn % der Dosis | Kollidon | Kreatinin | Inulin | Kreatinin-Clearance | Inulin-Clearance |
| | | | | cm³/min/m² | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 21. 28. 12. 1954 | 1 | 126 | 66 | 11 | 138 | 219 | 8 | 5 |
| Hund 7,8 kg | 2 | 152 | 73 | 10 | 158 | 242 | 6 | 4 |
| | 3 | 180 | 84 | 9 | 139 | 208 | 7 | 4 |
| | 4 | 204 | 50 | 5 | 80 | 174 | 6 | 3 |
| | 5 | 228 | 63 | 6 | 153 | 179 | 4 | 3 |

der Kollidonmenge, die im Harn erscheint, diese stimmt bei den Kollidonen I und II praktisch mit der Zufuhr überein. Man hätte vielleicht erwarten können, daß neben der Elimination durch die Nieren ein Teil

des Kolloides laufend in die Gewebe abwandert. Ein solcher Anteil ist aber jedenfalls nicht groß genug, um bei unseren Resultaten in Erscheinung zu treten. Bei den Kollidonen III und IV zeigt die Bilanz ein

Tabelle 9. *Plasma-Clearance-Werte.*

| | Hunde | | | Katzen | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zahl der | | cm³/min/m² | Zahl der | | cm³/min/m² |
| | Tiere | Std | | Tiere | Std | |
| Kreatinin . . . | 12 | 64 | 92,2 ± 3,6 | 3 | 13 | 29,5 ± 2,7 |
| Inulin . . . . . | 6 | 33 | 120,9 ± 12,8 | 3 | 16 | 51,2 ± 5,3 |
| Kollidon I . . | 7 | 40 | 60,4 ± 2,7 | 2 | 10 | 18,5 ± 1,9 |
| Kollidon II . . | 5 | 24 | 52,8 ± 4,3 | 2 | 8 | 25,0 ± 2,4 |
| Kollidon III . . | 2 | 12 | 23,2 ± 2,9 | 1 | 6 | 8,0 ± 0,8 |
| Kollidon IV . . | 1 | 5 | 8,2 ± 1,0 | — | — | — |

*Tabelle 10.*

| Kollidon | Hunde | | | | Katzen | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Z | Kollidon / Kreatinin × 100 | Z | Kollidon / Inulin × 100 | Z | Kollidon / Kreatinin × 100 | Z | Kollidon / Inulin × 100 |
| I | 29 | 68,0 ± 1,0 | 12 | 55,7 ± 3,0 | 5 | 56,8 ± 4,0 | 5 | 41,3 ± 3,3 |
| II | 23 | 67,0 ± 4,1 | 10 | 68,4 ± 6,6 | 8 | 54,1 ± 4,9 | 5 | 43,6 ± 2,0 |
| III | 6 | 23,7 ± 1,0 | 6 | 15,1 ± 1,0 | | — | 6 | 24,5 ± 3,3 |
| IV | 5 | 6,2 ± 0,7 | 5 | 3,8 ± 0,4 | | — | | |

*Tabelle 11.*

| Kollidon | | 1. Std | 2. Std | 3. Std | 4. Std | 5. Std | 6. Std |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | Hunde | 78 | 74 | 64 | 59 | 58 | 51 |
| I | Katzen | 60 | 52 | 48 | 46 | 40 | — |
| II | Hunde | 75 | 72 | 60 | 65 | 58 | 52 |
| II | Katzen | 54 | 52 | 53 | 41 | 43 | — |
| III | Hunde | 23 | 20 | 19 | 21 | 19 | 16 |
| IV | Hunde | 6,5 | 5 | 5,5 | 4,5 | 3,5 | — |

Defizit der stündlichen Harnausscheidung gegenüber der Zufuhr und eine eindeutige laufende Zunahme des Serumspiegels.

Beide Vorgänge entsprechen einander auch quantitativ in dem Sinne, daß wieder keine Kollidonabwanderung in die Gewebe erkennbar wird. Die Zunahme des Serumspiegels, die sich aus der Aufnahme des Defizits in das Blutvolumen errechnet, deckt sich befriedigend mit der beobachteten Zunahme. Bei dem Versuch 21 mit Kollidon IV z. B. beträgt

das stündliche Defizit 16 mg/kg. Das würde bei einer Plasmamenge von 50 $cm^3$/kg einer stündlichen Serumspiegelzunahme von 32 mg % entsprechen, beobachtet wurden 25 mg %.

Die eben besprochene Vollständigkeit der Wiederausscheidung der gewählten Kollidonzufuhr gibt bereits einen guten Maßstab für die Durchlässigkeit des Nierenfilters für Kollidone verschiedenen Molekulargewichtes. Die Berechnung der Clearance (Spalte 5) zeigt aber, daß dieser Meßwert der Nierenleistung ein viel prägnanteres Bild ergibt. Allerdings

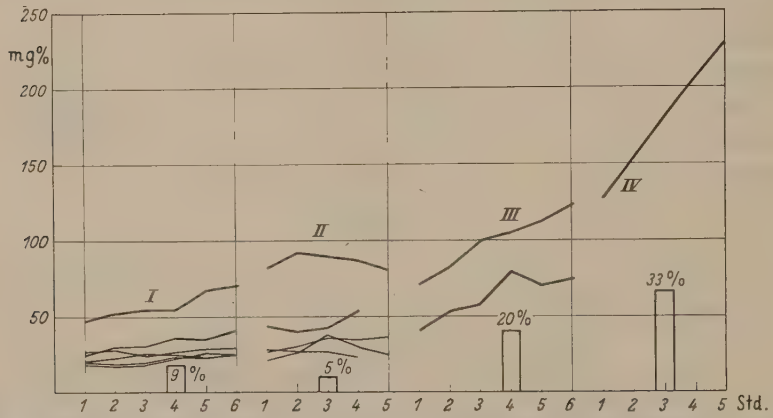



Abb. 2. Verhalten des Kollidonblutspiegels bei Hunden, die stündlich 50 mg/kg Kollidon verschiedenen Molekulargewichtes i.v. erhalten, und mittleres stündliches Defizit der Kollidonausscheidung im Harn in Prozent der Dosis.

lassen sich die Kollidon-Clearance-Werte erst dann fruchtbar vergleichen, wenn sie auf die Clearance-Werte von Prüfstoffen für das Glomerulusfiltrat bezogen werden.

Bei der Verwendung der beiden Prüfstoffe Kreatinin und Inulin haben wir keine volle Übereinstimmung erzielt. Dieses nicht ganz befriedigende Resultat kann wohl darauf zurückgeführt werden, daß keine besonderen Maßregeln ergriffen waren, um das „endogene Kreatinin" zu eliminieren, oder durch diätetische Vorbehandlung auf ein Minimum zu reduzieren. Bei der Gesamtbeurteilung möchten wir den mittels Inulin ermittelten Filtratwerten die größere Genauigkeit zuschreiben.

Es besteht keine Veranlassung daran zu zweifeln, daß Kollidon wie viele andere Kolloide seinen Übertritt in den Harn ausschließlich einer Passage des Glomerulusfilters verdankt. Die relative Kollidon-Clearance ist daher das geeignete Maß für das Verhalten von Kollidon verschiedener Molekulargröße gegenüber diesem Filter.

Das markanteste Ergebnis unserer Versuche ist der starke Abfall der Kollidon-Clearance beim Übergang von Kollidon II auf Kollidon III, also bei der Änderung des Molekulargewichtes von 12600 auf 16400.

Es drängt sich die Deutung auf, daß mit der entsprechenden Zunahme der molekularen Abmessungen eben eine Überschreitung der Größe der Mehrzahl der Poren des Glomerulusfilters erfolgt. Dies Resultat kommt trotz der sonstigen Streuungen in allen Einzelergebnissen scharf zum Ausdruck.

Bei der quantitativen Auswertung unserer Ergebnisse muß nun das in Tab. 11 dargestellte Verhalten berücksichtigt werden, das in einem kontinuierlichen Abfall der relativen Clearance im Laufe länger dauernder Versuche besteht.

Die Deutung für dieses Verhalten möchten wir darin erblicken, daß es nicht möglich war, im strengen Sinne polymereinheitliche Fraktionen von sehr eng begrenztem Molekulargewichtsbereich für unsere Versuche zu benutzen. Eine solche Forderung dürfte auch technisch kaum zu erfüllen sein. Infolgedessen fand in unseren Versuchen im Laufe der Beobachtung eine Verschiebung der molekularen Zusammensetzung des im Blut kreisenden Kolloides statt, in dem Sinne, daß es zu einer relativen Anhäufung der jeweils größten vorhandenen Molekulargewichte kam. Aus dieser Überlegung heraus ist es wohl berechtigt, die für die erste Versuchsstunde gefundenen Mittelwerte der relativen Clearance als für die betreffende Kollidonfraktion am meisten charakteristisch anzusehen.

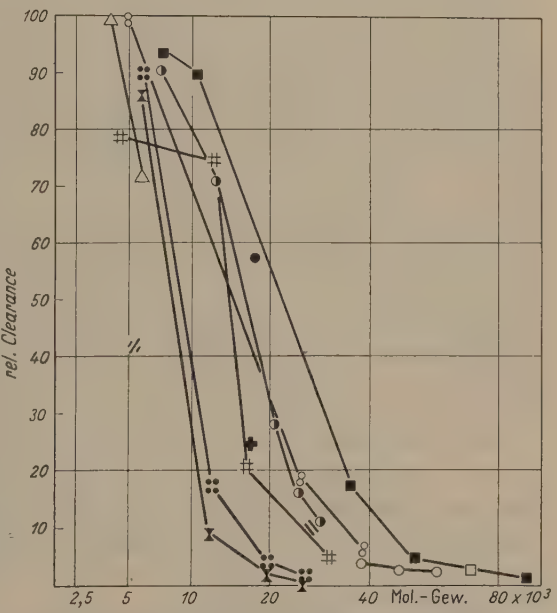



Abb. 3. Relative Clearance und Molekulargewicht von Kolloiden. *1* Gelatine ○——○ nach HOFFMANN u. KOZOLL (zit. nach SMITH); *2* Myoglobin ● (zit. nach SMITH); *3* Hämoglobin □ nach YUILE u. CLARK (zit. nach SMITH); *4* Ovomucoid ⧹⧹; *5* Lysozym ✚ nach MARSHALL u. DEUTSCH; *6* Fructosan ⫽⫽ nach BEATTIE u. CORCORAN; *7* Polyäthylenglykol △——△ nach SHAFFER u. Mitarb.; *8* Dextran ⁘——⁘ nach BREWER; *9* Dextran ■——■ nach GIEBISCH u. Mitarb.; *10* Dextran ⁘——⁘ wie *9* unter Verwendung der in der Fußnote zu Tab. 1 der Autoren genannten Molekulargewichte; *11* Dextran ◑——◑ nach WALLENIUS; *12.* Dextran ⧗——⧗ nach PAPPENHEIMER; *13* Kollidon #——# Werte dieser Arbeit.

Zum Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren mit anderen Kolloiden haben wir nun unsere und uns bekannt gewordene Beobachtungen über den Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und relativer Clearance in das Diagramm der Abb. 3 eingetragen.

Die Abszisse gibt hier die Molekulargewichte nicht linear, sondern entsprechend $\sqrt[3]{\text{Mol.-Gew.}}$, um der Änderung der linearen Abmessungen der Teilchen gerecht zu werden. Als besonders charakteristisch möchten wir diejenige Molekulargröße ansehen, für die die relative Clearance 50% des Filtratwertes beträgt. Für Kollidon liegt sie, wie oben bereits angedeutet, zwischen 12600 und 16400. Der Unterschied in den linearen Abmessungen dieser beiden Molekülgrößen beträgt nur etwa 9%. Unsere Ergebnisse liegen etwa im Mittelbereich der dargestellten Resultate.

Es fällt auf, daß die Kurvenschar rechts und links von Ergebnissen eingerahmt wird, die mit dem gleichen Kolloid-Dextran gewonnen sind. Sicherlich hängt das mit den Methoden zusammen, die zur Ermittlung der Molekulargewichte herangezogen worden sind. Die Messung des osmotischen Druckes gibt den „Zahlendurchschnitt", Lichtstreuung und Ultrazentrifuge liefern den „Gewichtsdurchschnitt". Einheitliche Kolloide (z. B. Myoglobin) würden dabei übereinstimmende Resultate liefern, Polymerisate mit im allgemeinen auch nach Fraktionierung uneinheitlichen Molekulargewichten führen dagegen zu verschiedenen Resultaten, die für den Zahlendurchschnitt wesentlich niedriger liegen können als für den Gewichtsdurchschnitt. Tatsächlich stellen in Abb. 3 die am weitesten links liegenden Kurven Zahlenmittel dar, die am weitesten rechts liegenden Gewichtsmittel. Es ist zu erwarten, daß bei einheitlicheren Fraktionen die Kurven nach der Mitte hin zusammenrücken. Ob darüberhinaus verschiedenartige Abweichung der Teilchen von der Kugelgestalt oder die Möglichkeit zur Entknäuelung oder andere Momente echte Abweichungen in der Beziehung zwischen Molekulargewicht und Clearance-Wert verursachen, sei offen gelassen.

Bei zunehmendem Molekulargewicht nimmt die Kollidon-Clearance weiter ab. Bei 30000 ist sie aber noch keineswegs verschwunden, sondern von einer Größenordnung, die noch eine relativ rasche Elimination solcher Kollidonmoleküle gewährleistet. Bei welchem Molekulargewicht die Filtrierbarkeit des Kollidons durch den Glomerulus überhaupt aufhört, haben wir nicht geprüft.

Ravin u. Mitarb. glauben, daß auf diesem Wege Kollidon bis zum Molekulargewicht 40000 in ein paar Tagen vollständig ausgeschieden werden kann. Wir glauben, daß gute Gründe für die Annahme dieser oder einer vielleicht nur wenig höheren Grenze sprechen. Die eingangs mitgeteilten Beobachtungen, wonach im Kaninchenharn nach Verabreichung eines Mischpolymerisates Fraktionen mit einem Molekulargewicht 60000 auftreten, bedürfen der Nachprüfung, da bei der Aufarbeitung dieser Fraktionen nicht so schonend (Trocknen in der Hitze) verfahren wurde, wie es nach neueren Erfahrungen erforderlich erscheint. Jedoch ist zur Beurteilung dieser Frage auch nicht die von uns herangezogene Clearance-Bestimmung die Methode der Wahl, sondern die Erfassung der Ausscheidungsbilanz über längere Zeiträume.

Ein bemerkenswertes Resultat unserer Untersuchungen ist die Beobachtung, daß bei der Kollidonfraktion mit dem niedrigsten Molekulargewicht, die wir untersucht haben, die gefundenen Clearance-Werte nur etwa $^3/_4$ der gleichzeitig gemessenen Kreatinin- bzw. Inulin-Clearance erreichten. In dieser Beziehung weichen unsere Ergebnisse von den Beobachtungen ab, die mit vielen anderen Kolloiden gemacht worden sind

und die im allgemeinen bei Molekulargewichten von dieser Größenordnung Clearance-Werte um 100% der Kreatinin-Clearance ergeben haben (vgl. Abb. 3).

Zur Deutung dieses Befundes bieten sich zwei Möglichkeiten:

1. Das im Blut kreisende Kollidon ist teilweise an das Plasmaeiweiß gebunden und somit nicht vollständig frei filtrierbar (Weese, vgl. auch Scholtan 1953).

2. Kollidon kann aus dem Glomerulusfiltrat im Laufe der Tubuluspassage teilweise rückresorbiert werden.

Bei einem teilweise rückresorbierten Stoff sollte man erwarten, daß bei Verkleinerung des Angebotes an den Tubulusapparat der rückresorbierte Anteil zunimmt, der Clearance-Wert entsprechend abnimmt.

Bei 2 Hunden haben wir die Clearance für unser Kollidon II mit Verabreichung von jeweils nur $^1/_5$ der sonst verwendeten Dosen, nämlich 10 mg/kg/Std geprüft. Im Durchschnitt von 6 einstündigen Perioden ergab sich bei dem einen Tier eine mittlere Plasma-Clearance von 84,5 und bei dem anderen Tier von 45,5 $cm^3/min/m^2$. Dieses Resultat spricht jedenfalls nicht für die Annahme einer Rückresorption.

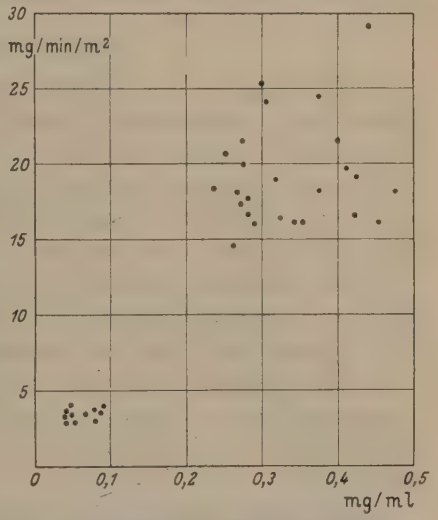



Abb. 4. Kollidon II. Geschwindigkeit der Ausscheidung in den Harn und Serumspiegel.

In Abb. 4 ist außerdem die Gesamtheit der von uns mit Kollidon II gefundenen Werte der Harnausscheidung in Abhängigkeit von der jeweiligen Serumkonzentration dargestellt worden.

Auch diese Darstellungsweise zeigt deutlich, daß die Annahme einer Rückresorption nach unseren Versuchen nicht zu begründen ist.

Nun ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß es nach der Kollidonverabreichung in den Tubulusepithelien zu einer vorübergehenden tropfigen Speicherung kommt. Diese Erscheinung ist aber wohl kaum auf andere Weise zu deuten, als daß die Tubulusepithelien vom Lumen aus während der Kollidonausscheidung mit dem Harn Kolloid aufnehmen. Es handelt sich dabei aber nicht um eine Rückresorption im Sinne der Nierenphysiologie, denn ebensowenig wie die Tubulusepithelien vom Capillarblut Kolloide aufnehmen können, können sie solche an dieses abgeben.

Am Schluß möchten wir noch auf eine auch praktisch interessante Seite unserer Befunde hinweisen. Herold u. Bräutigam haben das Kollidon in Form des Blutersatzpräparates Periston zur Prüfung der Glomeruluspermeabilität herangezogen. Tatsächlich muß nach unseren Resultaten eine etwaige Vergröberung dieses Filters in der Ausscheidung dieses unfraktionierten Kolloids zum Ausdruck kommen. In diesem Zusammenhang scheint uns beachtenswert, daß in allen unseren Versuchen an Katzen deutlich kleinere Kollidon-Clearance-Werte als bei Hunden aufgetreten sind, woraus wir schließen möchten, daß Katzen ein feinerporiges Glomerulusfilter haben als Hunde. Im gleichen Sinne hat auch Pappenheimer für Dextran bei Katzen kleinere relative Clearance-Werte gefunden als andere Autoren bei Hunden mit den gleichen Fraktionen.

## Zusammenfassung.

1. In Versuchen an Hunden und Katzen werden die Clearance-Werte für 4 verschiedene Kollidonfraktionen ermittelt und mit denjenigen von Kreatinin und Inulin verglichen.

2. Beim Übergang von einem Molekulargewicht von 16400 auf ein solches von 12600 wird eine Zunahme der Clearance-Werte von etwa 20% auf 70% der Kreatinin-Clearance beobachtet.

3. Bei weiterer Abnahme des Molekulargewichtes auf etwa 5000 findet nur noch eine geringe Zunahme der Kollidon-Clearance-Werte statt. Sie erreichen jedenfalls nicht die Glomerulusfiltratwerte.

4. Ein Kollidon mit dem Molekulargewicht 30000 weist einen Clearance-Wert von etwa 5% des Glomerulusfiltratwertes auf, womit die Eliminationsgeschwindigkeit aber noch nicht wesentlich beeinträchtigt ist.

Die benutzten Kollidonpräparate wurden uns von Herrn Dr. Scholtan überlassen, der auch freundlicherweise die Ermittlung der Molekulargewichte vorgenommen hat.

Fräulein U. Broeg habe ich für ihre sehr wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche und der Analysen zu danken.

## Literatur.

Ammon, R.: Med. Mschr. **1949**, 16. — Ammon, R., u. G. Braunschmidt: Biochem. Z. **319**, 370 (1949). — Beattie, J., and A. C. Corcoran: J. Clin. Invest. **31**, 445 (1952). — Brewer, D. B.: Proc. Roy. Soc. Med. **44**, 561 (1954). — Campbell, H., P. O. Kane, D. F. Muggleton et J. G. Ottewill: Journées Transfusion. Genève 12./13. 9. 1953, p. 38. — Cannan, R. K.: NRC-Report Aug. **1951**. — Giebisch, G., H. Lauson and R. F. Pitts: Amer. J. Physiol. **178**, 168 (1954). — Hecht, G., u. H. Weese: Münch. med. Wschr. **1943**, 11. — Herold, L. u. H. H. Bräutigam: Ärztl. Forsch. **8**, S. II/145 (10. 10. 1954). — Levy, G. B., u. D. Fergus: Anal. Chem. **25**, 1408 (Sept. 1953). — Marshall, M. E., u. H. F. Deutsch: Amer. J. Physiol. **163**, 461 (1950). — Menne, F., O. Wetter, L. Crämer u. L. Fischer: Klin. Wschr. **1952**, 603. — Pappenheimer, I. R.: Report to

NRC-Subcommittee on Shock, May 1954. — Poullain, P., et M. Piette: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **30**, 496 (1948). — Ravin, H., A. M. Seligman and J. Fine: New England J. Med. **247**, 92 (11. 12. 1952). — Reppe, W.: Polyvinylpyrrolidon, Weinheim/Bergstraße 1954. — Schoch, A., and A. Cámara: Methods in Med. Research, Chicago 1952, Vol. **5**, p. 214. — Scholtan, W.: Makromolekulare Chem. **7**, 209 (1952); **11**, 225 (1953). — Schubert, R.: Neue med. Welt **1950**, 78. — Shaffer, C. B., F. H. Critchfield and C. P. Carpenter: Amer. J. Physiol. **152**, 93 (1948). — Smith, H. W.: The Kidney, New York 1951. — Steele, R., D. D. van Slyke and J. Plazin: Ann. New York Acad. Sci. **55**, 419 (13. 9. 1952). — Wallenius, G: Renal Clearance of Dextran etc., Uppsala 1954. — Weese, H.: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 757. — Münch. med. Wschr. **1953**, 456. — Zipf, K.: Klin. Wschr. **1944**, 340.

Privatdozent Dr. G. Hecht,
Wuppertal-Elberfeld, Toxikol. u. Gewerbehygien. Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 62—68 (1955).

Aus dem Institut für normale u. pathologische Physiologie der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. M. Schneider).

# Sauerstoffverbrauch, Durchblutung und Vulnerabilität des Warmblütergehirns unter Megaphen (Chloropromazin).

Von

R. A. Frowein, H. Hirsch, D. Kayser* und W. Krenkel.

Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 18. März 1955.)*

Bei Untersuchungen über die Wirkungsweise des N-(3-Dimethylamino)-propyl-3-chlorphenothiazin = Megaphen (Chloropromazin, Largactil) haben experimentelle und klinische Beobachtungen zu verschiedener Beurteilung der Frage geführt, ob es eine spezifische Beeinflussung des Stoffwechsels bewirkt[1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 15, 17, 21, 23, 25].

Zur erneuten experimentellen Überprüfung dieser Frage, speziell hinsichtlich des Hirnstoffwechsels, wurden zwei Methoden gewählt:

1. die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches und des Blutdurchflusses des Gehirns in situ;

2. die Messung der Erholungslatenz des Gehirns nach perakuter totaler Ischämie. Die Erholungslatenz hat sich als gutes Maß der Vulnerabilität herausgestellt[12].

Im Hinblick auf die klinische Anwendung des Megaphens bei der kontrollierten Hypothermie und der kontrollierten Blutdrucksenkung wurden bei den letztgenannten Versuchen die Ausgangs- und Erholungsbedingungen hinsichtlich der Blutdruckhöhe und Hirntemperatur variiert.

## Methodik.

I. Messung des Sauerstoffverbrauchs des Gehirns am Hund: Zur Bestimmung der Hirndurchblutung und des Sauerstoffverbrauchs bedienten wir uns der Stickoxydul-Methode nach Kety u. Schmidt[16]. Morphin-Chloralose-Narkose (1 mg/kg Mo. s.c.; 0,1 g/kg Chloralose i.v.). Arterielle Blutentnahme seitenständig aus der A. femoralis. Dort gleichzeitige Blutdruckmessung mit Quecksilbermanometer. Entnahme des venösen Hirnblutes aus dem Sinus transversus. Wir punktierten den Sinus transversus ziemlich lateral vom Confluens sinuum. Bei einer Punktion in unmittelbarer Nähe der Medianlinie besteht die Gefahr, daß Blut der Spongiosa mit aspiriert wird. Bei der Präparation wurde jeglicher Blutverlust möglichst vermieden, da schon jede Analyse die Entnahme von 40—50 $cm^3$ Blut erfordert.

* Stipendiat des Herrn Kultusministers von Nordrhein-Westfalen.

Gerinnungsverhinderung mit Vetren. Körpertemperatur 36—38° rectal. Während der $NO_2$-Beatmung wurde nach der von SCHEINBERG u. STEAD[22] sowie BERNSMEIER und SIEMONS[2] angegebenen Methode Blut entnommen. Gleichmäßige kontinuierliche Blutentnahme durch Motorspritzen, die in 15 min 10 cm³ Blut aspirieren. Versuchsdauer gewöhnlich 11 min. Zu diesem Zeitpunkt arterielle und venöse $N_2O$-Konzentration annähernd gleich oder höchstens um 0,5 Vol-% differierend. Prüfung durch zusätzliche Entnahme einer arteriellen und venösen Blutprobe während Weiterbeatmung mit $N_2O$. Bestimmung der AVD-$O_2$ von Blutproben aus Arterie und venösem Sinus unmittelbar vor Beginn der Stickoxydul-Gasgemisch-Beatmung. Bestimmung von $O_2$ und $CO_2$ nach VAN SLYKE, von $N_2O$ nach der KETYschen Modifikation der von ORCUTT und WATERS angegebenen Methode[19].

Megaphen* 2, 4, 5 und 10 mg/kg i.v. oder i.m. Blutentnahme $1^1/_2$—2 Std nach der Injektion. In einigen Versuchen Wiederholung nach weiteren $1^1/_2$—2 Std bis zu 3 Entnahmen. Statistische Auswertung (t = Test) nach den Tafeln von FISHER u. YATES[9].

II. Messung der Erholungsfähigkeit nach perakuter totaler Ischämie des Katzengehirns:

Zum Studium der Erholungsfähigkeit des Gehirns unter Megaphen kann die Beobachtung der spontanen hirnelektrischen Tätigkeit nach zeitlich begrenzter perakuter totaler Ischämie herangezogen werden[12, 13].

Am narkotisierten Warmblütergehirn verschwinden die elektrischen Potentialschwankungen etwa 10—20 sec nach plötzlicher vollständiger Unterbrechung der Hirndurchblutung. Wird nach 60 sec Ischämiedauer die Blutzirkulation wieder freigegeben, so verstreicht eine bestimmte Zeit — die Erholungslatenz — bis spontane Hirnrindenpotentiale wieder registrierbar werden. Untersuchung mit der Methode des vollständig isolierten Katzenkopfes, welcher über eine Carotisanastomose mit einem Spendertier in Verbindung steht. Methode ist in früheren Arbeiten aus unserem Institut bereits beschrieben[12, 13]. Versuche an 12 Katzenpaaren. Narkose: 1 g/kg Urethan Spendertier, 100 mg/kg Evipan Empfängertier. Carotisblut des Spendertieres durchfließt auf der Anastomosenstrecke ein Wasserbad, wodurch Bluttemperatur zwischen 20 und 40° C variiert wird. Temperaturmessung durch NTC-Halbleiter-Widerstände (Philips) in der Anastomose und im Interhemisphärenspalt. Registrierung der elektrischen Spontanaktivität des Gehirns vom isolierten Kopf mit Knochen-Dura-Elektroden durch SCHWARZERschen Elektroencephalographen unipolar und bipolar vom Gyrus marginalis. Ischämien von 60 sec Dauer durch plötzliches Abklemmen der Anastomose. Blutdruckmessung innerhalb der Anastomosenstrecke seitenständig durch Quecksilbermanometer. In einzelnen Fällen war künstliche Sauerstoffbeatmung des Spendertieres notwendig. Zwischen den einzelnen Ischämien wurde eine genügend lange Erholungspause eingehalten; Erholungsrückstände lagen nicht vor.

Megaphen i.m. oder i.v. (2, 5 und 10 mg/kg), teilweise als lytische Mischung mit gleichen Mengen Atosil (N-(2'-Dimethylamino-2'-methyl-äthyl)-phenothiazinhydrochlorid) und Dolantin (1-Methyl-4-Phenylpiperidin-4-Carbonsäureäthyl-hydrochlorid). Die einzelnen Ischämien wurden, sofern nicht besonders angegeben, bei einem Mindestblutdruck von 100—120 mm Hg ausgeführt. Eine Versuchsreihe bei verschiedener Blutdruckhöhe und konstanter Temperatur von 31° C, eine weitere bei den einzelnen Temperaturen zwischen 39 und 21° C unter konstantem Blutdruck. Temperatur wurde schrittweise erhöht oder erniedrigt.

---

* Den Bayerwerken Leverkusen danken wir für die uns zur Verfügung gestellten Versuchsmengen.

## Ergebnisse.

### *I. $O_2$-Verbrauch und Durchblutung des Gehirns.*

Die Tab. 1 und 2 zeigen die bei den einzelnen Versuchen erhaltenen Werte von Hirndurchfluß, $O_2$-Verbrauch, Blutdruck und AVD $O_2$. Der mittlere Durchfluß sämtlicher Kontrollbestimmungen beträgt 35,8 cm³/100 g/min ($\sigma \pm 10{,}6$, $\sigma_M \pm 2{,}8$), der mittlere $O_2$-Verbrauch 2,66 cm³/100 g/min ($\sigma \pm 0{,}8$, $\sigma_M \pm 0{,}2$). Die Werte stimmen gut überein mit denen von Page, German u. Nims[20], die mit gleicher Methode ebenfalls beim Hund gewonnen wurden, und ebenso mit denjenigen von Noell u. Schneider[18] mit anderer Methodik. Die Versuche lassen erkennen, daß

*Tabelle 1.*

| Versuch Nr. | Kontrollen | | | | Megaphen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AVD $O_2$ | Durchfluß | Q $O_2$ | Blutdruck | AVD $O_2$ | Durchfluß | Q $O_2$ | Blutdruck | Dosis mg/kg |
| 1 | 8,2 | 32 | 2,6 | — | 9,2 | 22 | 2,0 | | 2 |
| 2 | 8,1 | 52 | 4,2 | 140 | 9,8 | 50 | 4,9 | 135 | 2 |
| 3 | 8,0 | 55 | 4,4 | 115 | 11,7 | 42 | 4,9 | 80 | 2 |
| 4 | 9,2 | 32 | 3,0 | 140 | 9,1 | 30 | 2,7 | 120 | 2 |
| 5 | 4,8 | 55 | 2,7 | 125 | 6,0 | 40 | 2,4 | 110 | 2 |
| 7 | 5,2 | 37 | 2,0 | 130 | 10,1 | 16 | 1,7 | 105 | 4 |
| 14 | 7,8 | 40 | 3,1 | 110 | 9,3 | 25 | 2,3 | 90 | 5 |
| 16 | 6,1 | 30 | 1,8 | 140 | 7,9 | 34 | 2,7 | 85 | 5 |
| | | | | | 8,9 | 28 | 2,5 | 85 | |
| 19 | 8,1 | 29 | 2,4 | 115 | 9,5 | 26 | 2,5 | — | 5 |
| | 7,5 | 31 | 2,3 | 110 | | | | | |
| 20 | 8,5 | 34 | 2,9 | 100 | 8,9 | 35 | 3,1 | 90 | 5 |
| | | | | | 8,9 | 37 | 3,3 | 70 | |
| 21 | 6,5 | 29 | 1,9 | 100 | 6,0 | 28 | 1,7 | 75 | 5 |
| | 7,7 | 24 | 1,8 | 110 | | | | | |
| 22 | 11,3 | 22 | 2,5 | 120 | 12,1 | 19 | 2,3 | 80 | 10 |

bei Einhaltung entsprechender Bedingungen am Hund durch Megaphengaben bis zu 5 und 10 mg/kg eine signifikante Änderung des Gehirnsauerstoffverbrauches und der Gehirndurchblutung innerhalb von 1 bis 3 Std nach der Medikamentinjektion *nicht* eintritt. Durch Megaphen wird jedoch eine meßbare Blutdruckänderung hervorgerufen. Der mittlere arterielle Blutdruck sank in unseren Versuchen im Mittel um etwa 25 mm Hg; die Erniedrigung schwankte von 5—55 mm Hg. Es wurde jedoch darauf geachtet, daß eine Senkung des mittleren Druckes unter den kritischen Wert von 60—70 mm Hg nicht eintrat. Wie aus der Tab. 1 ersichtlich, blieb bei den Kontrollen der Druck während der Versuchszeit konstant.

### *II. Verhalten der Hirnvulnerabilität.*

*a) Abhängigkeit der Erholungslatenz von der Blutdruckhöhe.* Die Abb. 1 zeigt die gewonnenen Werte im Verlauf eines Versuches (bei konstanter Hirntemperatur von 31° C). Bei einem Blutdruck von 120 mm Hg und mehr beträgt die Erholungslatenz hier 13—15 sec. Dieser Wert ändert sich nicht signifikant bei intravenösen Megaphengaben von 2 mg/kg bis zu einer Gesamtdosis von 8 mg/kg, vorausgesetzt, daß der Blutdruck in der genannten Höhe und darüber liegt. Mit einer Senkung des Ausgangs- und Erholungsdruckes (durch Drosselung des

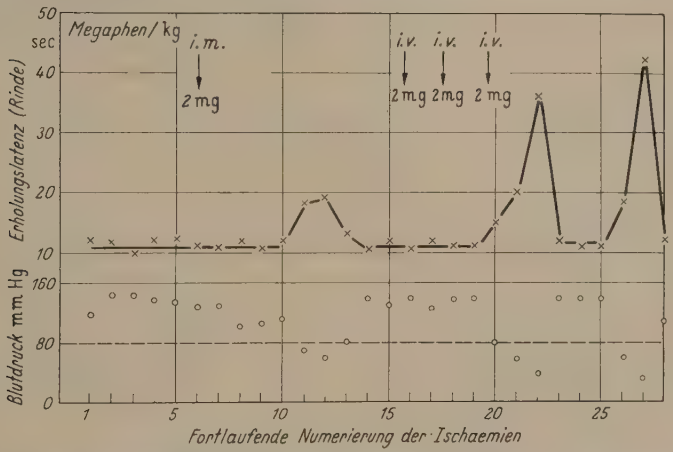



Abb. 1. Verhalten der Erholungslatenz der Spontanpotentiale der Hirnrinde in Abhängigkeit vom arteriellen Mitteldruck unter steigender Megaphendosierung. Die Werte stammen aus 28 perakuten totalen Ischämien von 60 sec Dauer bei konstanter Temperatur von 31° C.

venösen Rückflusses zum Spendertier) unter 80 mm Hg wird eine Verlängerung der Erholungslatenz erkennbar, bei 60 mm Hg signifikant, und bei 40 mm Hg beträgt die Verlängerung schon 300% der Normalwerte. Ausschlaggebend für die Gesamtbeurteilung ist aber vor allem, daß nach Wiedererhöhung des Spenderblutdruckes (Vermehrung des venösen Rückflusses zum Spender) auf über 100 mm Hg, die auch vor der Drucksenkung gemessenen Werte erneut gefunden werden. Es handelt sich demnach um eine reversible Änderung der Erholungsfähigkeit in Abhängigkeit von der Blutdruckhöhe. Der gleiche Einfluß der Blutdruckhöhe auf die Dauer der Erholungslatenz ist auch ohne Megaphen vorhanden. Er wurde früher bereits beschrieben (Gänshirt u. Mitarb.[13]). Durch den Druckverlust in der Anastomose liegt in diesen Versuchen der kritische Mitteldruck höher als am Ganztier.

*b) Abhängigkeit der Erholungslatenz von der Hirntemperatur.* In der Abb. 2 sind die Werte der Erholungslatenz bei verschiedenen Hirntemperaturen zwischen 21° und 39° eingetragen. Für die einzelnen

verschiedenen Temperaturen ergaben sich für Kontrollversuche und die Bestimmungen unter Megapheneinwirkung dieselben Zeiten für die Erholungslatenz. Sie zeigt eine Temperaturabhängigkeit, die in einer früheren Arbeit aus unserem Institut[12] bereits beschrieben wurde; in dieser Arbeit wurde auch ausführlich dargelegt, daß die Erholungslatenz ein Maß für die Vulnerabilität des Gehirns ist.

*Tabelle 2.*

| | 5 mg Megaphen | | Kontrollen | |
|---|---|---|---|---|
| | $O_2$-Verbr. | Durchfluß | $O_2$-Verbr. | Durchfluß |
| | $\bar{x}$ 2,59 | 30,4 | $\bar{x}$ 2,66 | 35,8 |
| | $\sigma$ 0,48 | 4,43 | $\sigma$ 0,78 | 10,64 |
| 2 mg Megaphen | | | | |
| $O_2$-Verbr. Durchfluß | t 1,37 | 1,39 | t 1,49 | 0,17 |
| $\bar{x}$ 3,38 36,8 | p < 0,2 | < 0,2 | p < 0,2 | < 0,9 |
| $\sigma$ 1,28 9,75 | | | | |
| 5 mg Megaphen | | | | |
| $O_2$-Verbr. Durchfluß | | | t 0,20 | 1,22 |
| $\bar{x}$ 2,59 30,4 | | | p < 0,9 | < 0,3 |
| $\sigma$ 0,48 4,43 | | | | |
| alle Megaphen-Dosierungen | | | | |
| $O_2$-Verbr. Durchfluß | | | t 0,34 | < 1,28 |
| $\bar{x}$ 2,78 30,8 | | | p < 0,8 | < 0,3 |
| $\sigma$ 0,96 9,07 | | | | |

## Besprechung der Ergebnisse.

Aus den geschilderten Versuchen geht hervor:

1. Der $O_2$-Verbrauch des Gehirns des chloralosenarkotisierten Hundes wird durch Megaphen nicht verändert.

2. Die Erholungsfähigkeit des Katzengehirns nach perakuter Ischämie von 60 sec ist bei Anwesenheit von Megaphen in dem gleichen Maße von Blutdruckhöhe und Hirntemperatur abhängig wie ohne das Phenothiazin.

Wir können daher schließen, daß Megaphen keine histotoxische Hypoxydose auslöst und daß die bisherigen klinischen und experimentellen Beobachtungen von Sauerstoffverbrauchssenkung des Gehirns auf unspezifischen Wirkungen beruhen (z. B. Blutdrucksenkung oder Senkung des gemessenen Umsatzes am Ganztier auf den wirklichen Grundumsatz).

Als Bernsmeier[3] eine Senkung der Hirndurchblutung um 14% und eine Verringerung des Hirn-Sauerstoffverbrauches um 24% durch Megaphen am Menschen beobachtete, vermutete er bereits, daß es sich hierbei nicht um eine spezifische Phenothiazinwirkung handele. L'Allemand u. Brendel[1] zeigten, daß der Sauerstoffverbrauch des Ganztieres durch die Phenothiazinkörner nicht unter die tiefsten

Werte (wirklicher Grundumsatz) gesenkt wird, die in maximaler Ruhe ohne pharmakologische Einwirkung beobachtet werden können. Filk u. Mitarb.[3] haben selbst bei hohen Dosierungen im Dauerversuch einen Rückgang anfänglicher Umsatzsenkung und auch der Muskeladynamie beobachtet. Ebenso sahen Perruzo u. Forni[21] bei Prüfung der Gewebsatmung an Hirnschnitten, daß eine anfängliche Senkung (ebenso wie bei Courvoisier u. Mitarb.[6], Gänshirt u. Brilmayer[11]) bei Kontrollen zwei Wochen nach der Injektion nicht mehr vorliegt. Wenn Gänshirt u. Brilmayer feststellten, daß sich der Megapheneffekt der Temperatursenkung hinzuaddiere, so ist bei den Warburg-Versuchen zu berücksichtigen, daß die Bluthirnschranke ausgeschaltet ist und das dem Hirngewebe unmittelbar zugefügte Megaphen einen anderen Zutritt zum Gewebe hat als bei den in vivo-Versuchen.

Cheymol u. Levassort[5] hatten eine Resistenzverminderung von Meerschweinchen und Ratten gegenüber Hypoxie unter Megaphen registriert: als die Tiere

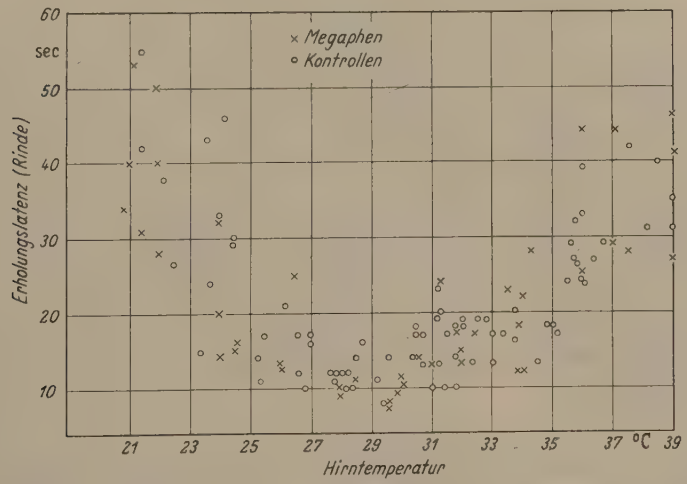



Abb. 2. Verhalten der Erholungslatenz der Spontanpotentiale der Hirnrinde bei verschiedener Hirntemperatur.

in Unterdruckkammern gebracht wurden, verstarben die Megaphentiere früher als die Kontrollen. Ebenso stellte Wiemers[24] eine Verkürzung der Überlebenszeit des Cornealreflexes am Kaninchen bei akuter kompletter Ischämie des Gehirns unter Megaphen fest. Es ist anzunehmen, daß in diesen Versuchen unter Megaphen eine Senkung des arteriellen Mitteldrucks unter die kritische Höhe eingetreten war.

## Zusammenfassung.

Die Messung von Sauerstoffverbrauch und Durchblutung des Gehirns an chloralosenarkotisierten Hunden ergab keine Änderung durch Megaphen in der Dosierung von 2—10 mg/kg. Nur bei Blutdrucksenkung unter eine kritische Höhe tritt eine unspezifische Erniedrigung ein.

Die Erholungsfähigkeit des Gehirns nach perakuter totaler Ischämie wird bei Variation der Gehirntemperatur und des Blutdruckes in gleicher

Weise bei den Kontrollen wie den Megaphentieren verändert. Die Auslösung einer histotoxischen Hypoxydose durch Megaphen in den genannten Dosierungen am Warmblütergehirn kann danach ausgeschlossen werden.

## Literatur.

[1] L'Allemand, H., u. W. Brendel: 60. Tag. dtsch. Ges. Innere Medizin, München 1954. — [2] Bernsmeier, A., u. K. Siemons: Pflügers Arch. **258**, 149 (1953). — [3] Bernsmeier, A.: Anaesthesist **3**, 149 (1954). — [4] Broglie, M., G. Jörgensen u. G. Voss: Ärztl. Wschr. **1954**, 697. — [5] Cheymol, L., et Ch. Levassort: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **35**, 831 (1953). — [6] Courvoisier, S., J. Fournel, R. Duerot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — [7] Decourt, Ph.: Rev. Path. comp. et Hyg. gén. **653**, 1569 (1953). — [8] Filk, H., K. Ritter, E. Sturmer u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1954**, 265. — [9] Fisher, R. A., and F. Yates: Oliver and Boyd, London 1949. — [10] Frowein, R. A., u. F. Loew: Zbl. Neurochir. **14**, 325 (1954). — [11] Gänshirt, H., et H. Brilmayer: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, IV, 467 (1954). — [12] Gänshirt, H., H. Hirsch, W. Krenkel, M. Schneider u. W. Zylka: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 431 (1954). — [13] Gänshirt, H., u. W. Zylka: Pflügers Arch. **256**, 181 (1952). — [14] Hirsch, H.: Anaesthesist **3**, 151 (1954). — [15] Jentzer, A., et J. Dubas: Journ. Transfusionn., Genf, 1953. — [16] Kety, S. S., and C. F. Schmidt: Amer. J. Physiol. **143**, 53 (1945). — J. Clin. Invest. **27**, 476 (1948). — [17] Laborit, H.: Presse méd. **1952**, 206. — 60. Tag. dtsch. Ges. Innere Medizin, München 1952. — [18] Noell, W., u. M. Schneider: Pflügers Arch. **250**, 35 (1948). — [19] Orcutt, F. S., and R. M. Waters: J. of Biol. Chem. **117**, 509 (1937). — [20] Page, W. R., W. J. German and L. F. Nims: Yale J. Biol. a. Med. **23**, 462 (1951). — [21] Peruzzo, L., et R. B. Forni: Presse méd. **1953**, 72, 1463. — [22] Scheinberg, P., and E. A. Stead: J. Clin. Invest. **28**, 1163 (1949). — [23] Siemons, K., u. A. Bernsmeier: Ges. dtsch. Neur. u. Psych., München 1953. — [24] Wiemers, K., u. G. Kraniak: Anaesthesist **3**, 151 (1954). — [25] Wirth, W.: 60. Tag. dtsch. Ges. Innere Medizin, München 1954.

Dr. R. A. Frowein,
Institut für normale und pathologische Physiologie der Universität, Köln.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 69—77 (1955).

Aus der Staatlichen Anstalt für experimentelle Therapie „Paul-Ehrlich-Institut" und dem Ferdinand-Blum-Institut für experimentelle Biologie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. R. Prigge).

# Vegetatives Nervensystem und Immunität.

## I. Über den Einfluß des vegetativen Nervensystems auf die Bildung des Diphtherie-Antitoxins beim Kaninchen.

Von

**H. J. Enenkel und H. W. Pedal.**

*(Eingegangen am 4. April 1955.)*

Wenn man die seit der ersten Veröffentlichung von Salomonsen u. Madsen aus dem Jahre 1898 erschienenen, zum Teil sich sehr widersprechenden Arbeiten über die Beziehungen zwischen vegetativem Nervensystem und Immunität überblickt (Übersichten bei Loumos, bei Frei und bei Campailla), so sind sich alle Untersucher und Referenten — mit einer Ausnahme aus der Erstlingszeit dieses Problems — lediglich in einem Punkte völlig einig: Ein Einfluß des vegetativen Nervensystems auf die Immunität wird nicht abgelehnt. Dasselbe gilt auch für die von Enenkel erwähnten Arbeiten, die sich mit experimentell oder pathologisch gesetzten Einflüssen des vegetativen Nervensystems auf die Antikörperbildung befassen.

Einige Autoren weisen darauf hin, daß die vegetative Tonuslage zum Zeitpunkt der Immunisierung ausschlaggebend sei für den Grad der folgenden Antikörperbildung, obwohl sie sich zum Teil in den übrigen Ergebnissen widersprechen[1].

Bogendörfer schloß aus seinen Versuchen an Hunden mit Gynergen bzw. nach Halsmarkdurchtrennung, die Antikörperbildung unterliege zumindest in ihrem Anfang einer Förderung durch den *Sympathicus*.

Umgekehrt war Belák mit seinen Mitarb. auf Grund vieler Versuche zur Annahme gelangt, daß ein vorherrschender *Parasympathicotonus*, hergestellt z. B. durch Pilocarpin-Injektionen zur Zeit der Einverleibung des Typhus-Vaccins, der einsetzenden Agglutininbildung förderlich sei; ein Überwiegen des Sympathicus in diesem Zeitpunkt sollte im Sinne der Hemmung wirken.

Wir entschlossen uns daher, zunächst den Einfluß vegetativ wirksamer Stoffe auf die erste Phase der Antikörperbildung nochmals zu

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Andererseits konnte Engelhardt (d. Z. **225**, 124 [1955]) aus seinen Beobachtungen bei „serumanaphylaktischen Reaktionen am nervenfreien Hühneramnion" schließen, daß dem Nervensystem bei der Antikörperbildung, bei der Gewebsbindung zirkulierender Antikörper und bei der Auslösung des anaphylaktischen Organschocks keine primäre Bedeutung zukommt.

untersuchen und knüpften an die Experimente von Goreczky u. Klinkhart an.

Diese Autoren hatten 30 min vor der intravenösen Immunisierung mit Diphtherie-Formol-Toxoid je 10 Kaninchen Pilocarpin bzw. Ephedrin intravenös injiziert und die in bestimmten Zeitabständen durch Blutentnahme aus der Ohrvene gewonnenen Seren der Einzeltiere jeder Gruppe gewichtsanteilmäßig gemischt. Die Antitoxin-Titer dieser Gruppen-Mischseren wurden nach der von Jensen angegebenen Modifikation der von Römer für Meerschweinchen und von Fraser u. Wigham für Kaninchen entwickelten Intracutan-Methode bestimmt.

Aus den Untersuchungen von Goreczky u. Klinkhart ergibt sich durch Addition der an den einzelnen Blutentnahme-Tagen für die betreffende Gruppe gewonnenen Durchschnitts-Titer — in Übereinstimmung mit Belak —, bei der pilocarpinbehandelten Gruppe eine höhere und bei der ephedrininjizierten Gruppe eine niedrigere Titersumme als bei der Kontrollgruppe. Werden dagegen die Gruppentiter — am besten in logarithmischem Maßstab — gegen die Zeit aufgezeichnet, so sind größere Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nicht zu erkennen. Aus kriegsbedingten Gründen war es Goreczky u. Klinkhart nicht möglich, Titerbestimmungen von jedem einzelnen Tier durchzuführen, so daß die Bewertung der Ergebnisse und eine Aussage darüber vorerst nicht möglich war, wie weit die Unterschiede über das Zufällige hinaus gehen und statistisch gesichert werden können.

## Versuchsanordnung.

35 Kaninchen (weiße Wiener) im Gewicht von 1220—3500 g wurden nach Prigge (1) auf 4 Gruppen so verteilt, daß deren Durchschnittsgewichte fast völlig übereinstimmten. Außerdem wurden Unterschiede zwischen den Gruppen in bezug auf Fütterung, Wärme, Licht, Tür- bzw. Fensternähe durch entsprechende Verteilung im Stall schon eine Woche vor Versuchsbeginn ausgeschaltet. Die Wägungen an den Behandlungs- und an den Blutentnahme-Tagen fanden stets morgens vor der Fütterung statt. 30 Tiere (Gruppe 1, 2 und 3) wurden am 9. 5. 1953 mit einem Diphtherie-Impfstoff der Behring-Werke, Marburg/L. (an Aluminiumhydroxyd adsorbiertem Diphtherie-Formol-Toxoid) Kontr. Nr. 182, welcher in 1 $cm^3$ 387 SE enthält, immunisiert. Jedes Kaninchen erhielt unabhängig von seinem Körpergewicht 1 $cm^3$ des mit 0,85%iger Kochsalzlösung auf 300 SE/$cm^3$ eingestellten Impfstoffes in die Ohrvene. Die Tiere 1—10 (1. Versuchsgruppe — Vergleichsgruppe) wurden abgesehen von der Immunisierung nicht weiter behandelt. Die Tiere 11—20 (2. Versuchsgruppe) erhielten 8 min vor der Immunisierung sowie 8 und 16 Std nach der Immunisierung 2,5 mg Pilocarpinum hydrochlor. puriss. cryst. „Merck" pro Kilogramm Körpergewicht in einer 0,25%igen Lösung i. v. Die Tiere 21—30 (3. Versuchsgruppe) erhielten 8 min vor der Immunisierung sowie 8 und 16 Std nach der Immunisierung 12,5 mg Ephedrinum hydrochloricum „Merck" pro Kilogramm Körpergewicht in einer 1,25%igen Lösung i. v.

Die Kontrollgruppe (Nr. 31—35) wurde weder immunisiert noch mit einem der beiden Pharmaka behandelt; die Tiere dieser Gruppe dienten vor allem zur Kontrolle der im Zeitpunkt der Toxininjektion bestehenden *normalen* Gifttoleranz des für die Untersuchungen verwandten Tiermaterials. Die Versuchstiere 4, 14 und 32 starben interkurrent (Verletzung, Trommelsucht), so daß für die Auswertung die Gruppen 1 und 2 aus je 9 Kaninchen bestanden, die Gruppe 3 aus 10 und die

Kontrollgruppe aus 4 Tieren. Alle übrigen Tiere waren gesund und zeigten normale Gewichtsverläufe. 97 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Kaninchen nochmals i. v. immunisiert und die Gruppen 2 und 3 wie oben angegeben mit denselben vegetativ wirksamen Pharmaka behandelt.

*Bestimmung des Antitoxin-Titers und der Toxin-Toleranz.*

Allen Tieren wurde 1 Tag vor der ersten Immunisierung 5—8 cm³ Blut für die Antitoxin-Titration aus der Ohrvene entnommen, sowie den Tieren 1—30 (Gruppe 1, 2 und 3) 3, 6, 10, 14, 18, 22, 25, 28, 32 und 96 Tage nach der ersten Immunisierung und 3, 7 und 11 Tage nach der zweiten Immunisierung, jeweils morgens vor dem Füttern. Die Sera wurden nach der Methode von Fraser u. Wigham und Jensen intracutan an je 2 nur zu Meßzwecken dienenden, also nicht zu den Versuchs- und Kontrollgruppen gehörenden depilierten weißen Wiener- oder Riesen-Kaninchen titriert. Als Titrationsbasis diente zunächst der LRm (1/30000 AE)[1], welcher Antikörper-Konzentrationen bis zu einem Mindestgehalt von 0,0005 AE/cm³ erfaßt, später der LRm (1/3000 AE), der Titrationen, bis herab zu 0,005 AE/cm³ erlaubt. Entsprechend einem von Prigge (3) angegebenen Verfahren wurde die Hautreaktion 42 und 66 Std nach der intracutanen Injektion abgelesen und durch lineare Interpolation die Serummenge ermittelt, welche eben noch eine Reaktion von 9 mm Durchmesser zuließ; der Antitoxingehalt dieser Serummenge, der infolge der Variabilität des Tiermaterials von dem in Klammern angegebenen Wert nach oben oder unten abweichen kann, wurde durch *Vergleich mit dem exakt geeichten Diphtherie-Standardserum* des Paul-Ehrlich-Instituts errechnet. Aus beiden Werten wurde das geometrische Mittel gebildet. Das geometrische Mittel der an zwei Kaninchen auf diese Art erhaltenen Werte ist als Titer des untersuchten Serums angegeben (Tab. 1). Mit den Sera der folgenden Blutentnahme-Tage wurden Titerbestimmungen für jedes einzelne Tier durchgeführt: 6, 14, 25, 28, 32 Tage nach der ersten Immunisierung und 11 Tage nach der zweiten Immunisierung. Die an den anderen Blutentnahme-Tagen erhaltenen Sera wurden den Körpergewichten entsprechend für jede Gruppe gemischt (0,2 cm³ je Kilogramm Körpergewicht) und als Mischserum titriert. „Einzelserum"- *und* „Mischserum"-Titrationen wurden mit den Sera der Blutentnahmen 28 Tage nach der ersten Immunisierung und 11 Tage nach der zweiten intravenösen Immunisierung vorgenommen.

Darüber hinaus wurden 34 Tage nach der ersten intravenösen Immunisierung bei allen Versuchstieren in die depilierte Haut fallende Dosen des Diphtherie-Standard-Toxins T 1600 injiziert. Es wurde sodann die Giftmenge bestimmt, die jedes Tier intracutan zu entgiften imstande war, wobei nach dem obengenannten Verfahren diejenige Toxindosis ermittelt wurde, welche sich durch das in der Haut des Tieres vorhandene Antitoxin gerade soweit neutralisieren ließ, daß der Reaktionsdurchmesser 9 mm betrug. Die Giftmengen wurden ausgedrückt in LRm (1/1000 AE). Dieser Wert war in umfangreichen Untersuchungen im Paul-Ehrlich-Institut für das Standardtoxin T 1600 mit $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ mg ermittelt worden.

## Ergebnisse.

Der Titer der nichtimmunisierten Kontrollgruppe wurde nur einmal und zwar als Mischserum bestimmt. Er lag unterhalb der erfaßbaren Antitoxinmenge. Das Mittel der bei diesen Tieren die gewählte Grenzreaktion von 9 mm ∅ hervorrufenden

[1] LR = Limes Reactionis = die Di.-Toxinmenge, die mit 1 AE bzw. mit dem in Klammern angegebenen Bruchteil der Antitoxineinheit nach intracutaner Injektion in einem Totalvolumen von 0,1 cm³ beim Kaninchen eine umschriebene Hautrötung von 9 mm erzeugt. LRm = Limes Reactionis medius = das arithmetische Mittel der LR-Bestimmungen an einer größeren Anzahl von Tieren.

Giftmengen betrug 0,0025 LRm (1/1000 AE), lag also noch beträchtlich unter dem bei anderen Tieren beobachteten Durchschnittswert von 0,0125 LRm (1/1000 AE) (Prigge 3).

Nach Jensen können natürliche Antitoxine gegen das Diphtheriegift bei 3 von 800 Kaninchen vorkommen; solche wurden, soweit die Verwendung von

Tabelle 1. *Serum-Antitoxin-Titer in AE/cm³.*

| Zeitabstand in Tagen von 1. i. v. Immunisierung | Zeitabstand in Tagen von 2. i. v. Immunisierung | Blutentnahme Nr. | Gruppe 1 9 Tiere Impfstoff | | Gruppe 2 9 Tiere Pilocarpin u. Impfstoff | | Gruppe 3 10 Tiere Ephedrin u. Impfstoff | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Einzelsera[1] | Mischserum[2] | Einzelsera[1] | Mischserum[2] | Einzelsera[1] | Mischserum[2] |
| 1 vor | | I | | ∅ | | ∅ | | ∅ |
| 0 | 1. i. v. Immunisierung | | | | | | | |
| 3 nach | | II | | ∅ | | ∅ | | ∅ |
| 6 | | III | ∅ | | 0,0002 | | ∅ | |
| 10 | | IV | | 0,12 | | 0,09 | | 0,10 |
| 14 | | V | 0,004 (0,003) | | 0,008 (0,007) | | 0,016 (0,015) | |
| 18 | | VI | | 0,12 | | 0,12 | | 0,15 |
| 22 | | VII | | 0,13 | | 0,16 | | 0,18 |
| 25 | | VIII | 0,06 (0,06) | | 0,05 (0,04) | | 0,09 (0,08) | |
| 28 | | IX | 0,06 (0,06) | 0,12 | 0,05 (0,04) | 0,13 | 0,06 (0,06) | 0,17 |
| 32 | | X | 0,10 (0,10) | | 0,06 (0,05) | | 0,16 (0,14) | |
| 34 | Intracut. Intoxikation | | | | | | | |
| 96 | 1 vor | XI | | 2,6 | | 1,0 | | 1,3 |
| 97 | 2. i. v. Immunisierung | | | | | | | |
| 100 | 3 nach | XII | | 2,6 | | 1,7 | | 2,0 |
| 104 | 7 | XIII | | 19,0 | | 17,2 | | 22,8 |
| 108 | 11 | XIV | 24,8 (24,6) | 30,3 | 28,0 (26,9) | 35,4 | 38,2 (37,7) | 33,9 |

[1] Geometrisches Mittel der Titer der Einzelseren (die Zahlen in Klammern stellen die gewogenen geometr. Mittel dar).

[2] Zur Titration der Mischsera wurden die Sera der Einzeltiere einer Gruppe den Körpergewichten entsprechend gemischt (0,2 cm³ Serum je kg Körpergewicht).
∅ nicht meßbar, jedenfalls weniger als 0,0005 AE/cm³.

Tabelle 2. *Gegenüberstellung der Körpergewichte, der Serum-Antitoxintiter und der intracutan neutralisierten Giftmengen 32 bzw. 34 Tage nach der 1. i.v. Immunisierung.*

| Tier Nr. | Körpergewicht in g | Antitoxintiter in AE/cm³ | | Neutralisierte Giftmenge LRm (0,001 AE) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Einzeltier | Geom. Mittel der Gruppe | Einzeltier | Geom. Mittel der Gruppe |
| **Gruppe 1: Impfstoff** | | | | | |
| 6 | 1980 | 0,17 | | 26,8 | |
| 1 | 1650 | 0,16 | | 11,9 | |
| 9 | 2680 | 0,15 | | 28,4 | |
| 3 | 2500 | 0,15 | | 13,0 | |
| 7 | 2350 | 0,15 | 0,10 | 5,0 | 8,9 |
| 8 | 2350 | 0,08 | | 16,4 | |
| 10 | 2900 | 0,07 | | 5,5 | |
| 2 | 2420 | 0,07 | | 4,1 | |
| 5 | 2800 | 0,03 | | 1,6 | |
| 4 | † | — | | — | |
| **Gruppe 2: Pilocarpin u. Impfstoff** | | | | | |
| 11 | 2000 | 0,25 | | 17,2 | |
| 16 | 1750 | 0,13 | | 38,2 | |
| 12 | 2250 | 0,12 | | 32,1 | |
| 18 | 2770 | 0,08 | | 17,8 | |
| 17 | 2080 | 0,06 | 0,06 | 6,6 | 6,7 |
| 19 | 2770 | 0,04 | | 9,7 | |
| 13 | 2350 | 0,04 | | 5,6 | |
| 20 | 2900 | 0,03 | | 1 | |
| 15 | 2800 | 0,02 | | 0,21 | |
| 14 | † | — | | — | |
| **Gruppe 3: Ephedrin u. Impfstoff** | | | | | |
| 27 | 2000 | 0,62 | | 31,8 | |
| 21 | 1750 | 0,28 | | 15,0 | |
| 29 | 2680 | 0,26 | | 30,0 | |
| 22 | 2000 | 0,22 | | 18,7 | |
| 28 | 2460 | 0,20 | 0,16 | 26,8 | 9,7 |
| 24 | 2640 | 0,18 | | 10,6 | |
| 23 | 2580 | 0,15 | | 7,4 | |
| 26 | 2050 | 0,10 | | 5,1 | |
| 25 | 3020 | 0,05 | | 2,7 | |
| 30 | 3250 | 0,03 | | 0,92 | |
| **Gruppe 4: Kontrolle** | | | | | |
| 35 | 3870 | — | Mischserum der Gruppe | 0,005 | |
| 34 | 2600 | — | | 0,004 | |
| 31 | 2050 | — | ∅ | 0,002 | 0,0025 |
| 33 | 2630 | — | | 0,001 | |
| 32 | † | — | | — | |

∅ nicht meßbar, jedenfalls weniger als 0,0005 AE/cm³

Mischsera bei der ersten Blutentnahme einen solchen Schluß zuläßt, bei keinem unserer Versuchs- und Kontrolltiere gefunden, wie die Tab. 1 u. 2 zeigen. Bei allen immunisierten Tieren verhalten sich die Antitoxin-Titer nach der ersten intravenösen Diphtherie-Toxoid-Injektion in der für eine Primärimmunisierung charakteristischen Art (Jensen; Goreczky u. Klinkhart). Der Titerverlauf für die 3 Versuchsgruppen ist aus Tab. 1 ersichtlich. Meßbare Antitoxinmengen treten erstmals 10 Tage nach der Immunisierung auf (Titration als Mischserum), wogegen die Untersuchung der Einzelsera 6 Tage nach der Immunisierung nur bei Tier 19 (Pilocarpin-Gruppe) einen erfaßbaren Wert lieferte. Somit ist der Beginn der Antitoxinabgabe ins zirkulierende Blut in diese Zeitspanne zu verlegen. In den folgenden 3 Wochen stiegen dann die Titer in typischer Weise weiter an.

Zwischen dem 32. und dem 96. Tage nach der ersten Immunisierung fanden keine Titerbestimmungen statt. In dieser Zeit sind aber bei allen Tieren die Antitoxintiter sehr stark angestiegen. Obwohl nach Glenny u. Südmersen (zit. bei Borneff u. Lennert) das Maximum der Antitoxin-Titer oft etwa nach 8 Wochen (= 56 Tagen) zu erwarten ist, hat in unserem Falle offenbar das 34 Tage nach der intravenösen Erstimmunisierung allen Kaninchen in die Haut injizierte Diphtherie-Toxin als spezifischer Sekundärstimulus die weitere Titersteigerung verursacht. Die Titerentwicklung nach der zweiten intravenösen Toxoidinjektion (dritte Antigenverabreichung) imponiert als typische Reaktion auf einen wiederholten Immunisierungsreiz desselben Antigens mit einem raschen und hohen Anstieg innerhalb weniger Tage (vgl. Ipsen; Borneff u. Lennert).

Sowohl nach der V. wie nach der X. Blutentnahme wurden bei den mit Ephedrin behandelten Kaninchen im Durchschnitt höhere Antitoxin-Titer gefunden als bei den übrigen Tieren. Und zwar wiesen die Sera der V. Blutentnahme 14 Tage nach der Immunisierung (Einzelsera) einen statistisch gut gesicherten Unterschied zwischen den geometrischen Antitoxintiter-Mittelwerten[1] der 3. und 1. Versuchsgruppe auf ($0{,}001 < P < 0{,}01$), während sich für die 32 Tage nach der ersten intravenösen Immunisierung bei der X. Blutentnahme gewonnenen Einzelsera ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Versuchsgruppen 3 und 2 ergab ($0{,}001 < P < 0{,}01$). Der zwischen den Gruppen 2 und 1 bei der X. Blutentnahme beobachtete Titerunterschied ließ sich dagegen auch mit Hilfe der Covarianz-Analyse nicht hinreichend sichern. Diese wurde unter Berücksichtigung der Körpergewichte durchgeführt und ergab als Wahrscheinlichkeit dafür, daß eine dem beobachteten Unterschied der Titer-Mittelwerte entsprechende oder ihn übertreffende Differenz rein zufällig auftreten kann, noch immer $0{,}05 < P < 0{,}1$. Da sogar eine wesentlich bessere statistische Sicherung im biologischen Versuch noch keinen *absoluten* Beweis für die erhobenen Befunde bedeutet, wie Günther erst kürzlich erneut hervorgehoben hat, wird man die Ergebnisse nur in dem Sinne deuten dürfen, daß die Antitoxin-Titer

[1] Der Auswertung unseres Materials haben wir die geometrischen Mittel der bei den einzelnen Tieren jeder Versuchsgruppe gewonnenen Antitoxintiter zugrunde gelegt. Außerdem wurde die gewogenen geometrischen Mittel gebildet, wobei die Körpergewichte auch als Gewichte für die Berechnung dienten. Die so erhaltenen Werte weichen von den einfachen geometrischen Mitteln kaum ab.

der Ephedrin-Gruppe etwa vom 14. Tage ab sicher *erhöht* waren. Die Frage, ob demgegenüber eine *Depression* der Antitoxin-Titer bei den mit Pilocarpin behandelten Tieren bestand oder ob Pilocarpin *ohne Einfluß* auf den Antitoxin-Titer war, wird man vor allem deshalb zunächst noch offen lassen müssen, weil zwischen den Differenzen der Mittelwerte der Gruppen 2 und 1 von der V. bis zur X. Blutentnahme eine Vorzeichenumkehr stattgefunden hat. Diese Vorzeichenumkehr (Unterschied zwischen Gruppe 2 und Gruppe 1 bei der V. Blutentnahme + 0,004AE/cm³, bei der X. Blutentnahme — 0,04 AE/cm³) läßt sich unschwer durch die Vorstellung erklären, daß es sich hier lediglich um zufallsbedingte Schwankungen innerhalb zweier an sich gleichartigen und im allgemeinen auch gleich verlaufenden Titerbewegungen handelt (vgl. VIII. und IX. Blutentnahme). Welche von den beiden angedeuteten Möglichkeiten als zutreffend anzusehen ist, wird in einer späteren Mitteilung diskutiert werden.

Die Titrationen nach der intracutanen Giftapplikation, insbesondere aber nach der zweiten intravenösen Immunisierung ergaben keine gesicherten Unterschiede zwischen den verschieden behandelten Gruppen. Dies läßt sich damit gut erklären, daß die nach der Erstimmunisierung vorkommenden Differenzen nach älteren Erfahrungen anderer Autoren (Ipsen, Holt) durch weitere immunisierende Effekte verwischt werden.

Ein Vergleich der Mittelwerte der Logarithmen der intracutan neutralisierten Giftmengen ergab für keines der 3 Gruppenpaare wesentliche Unterschiede. Dies war auch nicht zu erwarten, weil die Streuung der Logarithmen der neutralisierten Giftmengen wesentlich höher war als die Streuung der Logarithmen der Antitoxin-Titer, bei der intracutanen Giftneutralisation von Tier zu Tier also erheblich größere Unterschiede auftraten, als es bei den an sich schon großen Unterschieden der Antikörpertiter ihrer Sera der Fall war. Immerhin zeigt die Gegenüberstellung in Tab. 2, daß Antikörpertiter und Grad der intracutanen Giftneutralisation nicht nur in den Gruppenmitteln, sondern sogar beim Einzeltier weitgehend parallel gehen.

Bei der IX. und XIV. Blutentnahme lagen die Mischsera — mit einer Ausnahme (Gruppe 3) — in ihrer Titerhöhe über den Einzelsera, wobei allerdings zu beachten ist, daß die Titer der Mischsera — gemäß ihrer Zusammensetzung — dem gewogenen *arithmetischen* Mittel der Einzelsera entsprechen. Zur Aufklärung dieser Beobachtung wurden unter Berücksichtigung der Körpergewichte auch die gewogenen arithmetischen Mittel der entsprechenden Einzelsera errechnet; sie betrugen bei der IX. Blutentnahme in Gruppe 1: 0,07, in Gruppe 2: 0,07, in Gruppe 3: 0,08 AE/cm³ (statt 0,12—0,13—0,17 AE/cm³), bei der XIV. Blutentnahme in Gruppe 1: 21,1, in Gruppe 2: 31,7, in Gruppe 3: 44,9 AE/cm³ (statt 30,3—35,4—33,9 AE/cm³). Gegenüber diesen Werten lagen die Titer der Mischsera also in 5 von 6 Fällen höher; nur in Gruppe 3 war bei der XIV. Blutentnahme der Titer des Mischserums geringer als der Mittelwert der Einzelsera. Ob den beobachteten Unterschieden eine mehr als zufällige Bedeutung zukommt, insbesondere ob sie grundsätzlicher Art sind, etwa in dem Sinne, daß bei der Mischung von Sera verschiedener Avidität eine unkontrollierbare gegenseitige Beeinflussung der Titer erfolgt, müßten Untersuchungen mit zweckentsprechender Versuchsanordnung klären. Auffällig ist jedoch

die Diskrepanz bei der zeitlichen Verfolgung des Antitoxinanstieges: die Werte der V. Blutentnahme, die durch Titration der Einzelsera gefunden wurden, liegen erheblich unter denen der beiden benachbarten Mischsera IV und VI. Da die Sera der V. Entnahme aber noch auf der Basis LRm (1/30000 AE) titriert werden mußten, wogegen die Untersuchung der Mischsera IV und VI bereits auf der Basis LRm (1/3000 AE) möglich war, ist dieser Unterschied ohne zusätzliche Annahmen erklärbar. Ipsen (zit. nach Prigge 2) weist nämlich darauf hin, daß eine gute Vergleichsmöglichkeit nur gegeben ist, wenn die Bestimmungen auf der gleichen Titrationsbasis erfolgen, und Jerne u. Maaloe (zit. nach Prigge 2) zeigten, daß Sera bei Titration auf einer niedrigeren Basis gegenüber der Bestimmung auf höherer Basis erniedrigte Werte liefern können. Diese Erklärung läßt sich aber auf die bei der X. und XIV. Blutentnahme gemachten Beobachtungen nicht übertragen, da hier nur mit dem LRm (1/3000 AE) gearbeitet wurde.

Während unsere Versuche eine deutliche Beeinflussung des Antitoxin-Titers durch Ephedrin erkennen lassen, zeigt die graphische Verfolgung der von Goreczky u. Klinkhart gefundenen Antitoxin-Titer keine wesentliche Differenz zwischen den verschieden behandelten Gruppen. Ein Unterschied zwischen Goreczkys Untersuchung und unserer Arbeit besteht allerdings darin, daß bei jener die Immunisierung 30 min nach der einmaligen Gabe der Stimulantien folgte, während wir diese Zeit auf 7—8 min verkürzten, aber Pilocarpin bzw. Ephedrin dreimal in achtstündigem Abstand verabreichten. Mit diesem Verfahren schien uns besser gewährleistet, daß die celluläre Verankerung des Antigens in der gewünschten parasympathischen bzw. sympathischen Phase stattfindet. Den Unterschieden in der absoluten Titerhöhe zwischen unseren Versuchen und denjenigen von Goreczky messen wir geringere Bedeutung bei; sie sind nicht groß genug, um zur Annahme zu berechtigen, sie seien ausschlaggebend für die unterschiedlichen Ergebnisse der pharmakologischen Behandlung, etwa derart, daß bei Goreczky die Antwort auf den Antigenreiz zu stark ausfiel, um durch die betreffenden Dosen der Wirkstoffe beeinflußt zu werden, während bei uns der geringere antigene Effekt leichter quantitativ abgeändert werden konnte.

Die Ergebnisse von Belák stimmen ebenfalls nicht mit unseren Befunden überein. Hier bestehen jedoch noch größere Unterschiede in Anlage und Durchführung der Versuche.

Allein schon die Tatsache, daß wir mit einem bis auf seine immunisierende Wirkung pharmakologisch effektarmen Antigen arbeiteten, könnte wesentlich sein. Belak verwendete meistens Typhus- oder Paratyphus-Vaccin, das bekanntermaßen als vegetativer Reiz- und Fieberstoff gerade in der von ihm beachteten Zeit nach der Antigeninjektion deutliche Veränderungen der vegetativen Tonuslage verursacht (Hoff). Ob andererseits durch unsere Versuchsanordnung nach Ephedrin und nach Pilocarpin vielleicht eine starke Gegenregulation in dem dafür kritischen Zeitpunkt nach der Immunisierung auf den Plan gerufen wurde, die den erstrebten primären Charakter der vegetativen Beeinflussung mit ihrer gegensätzlichen Wirkung auf die Antikörperbildung völlig überdeckt haben müßte, wäre noch zu klären. Versuche, die diese Frage streifen, sind im Gange. Gillissen fand bei Meerschweinchen erst mehrere Tage nach Beginn der täglichen Prostigmin- bzw.

Ephedringaben eine Umkehr der durch die Pharmaka hervorgerufenen Nebennierenrinden-Transformationen.

Wenn es auf Grund unserer Versuchsergebnisse auch erlaubt ist, zu sagen, daß die zu Beginn der Antikörperbildung erfolgte Behandlung mit dem als Sympathikomimeticum bezeichneten Ephedrin die Antitoxin-Titer höher werden ließ als bei den unbeeinflußten oder bei den mit dem parasympathikomimetischen Pilocarpin behandelten Tieren, so ist doch zu berücksichtigen, daß keinesfalls die Gesamtwirkung dieser Pharmaka mit der ihnen zugesprochenen vegetativen Tonuslage identifiziert werden kann.

Immerhin möchten wir darauf hinweisen, daß sich unsere Ergebnisse wenigstens formal in Übereinstimmung mit denen mehrerer anderer Autoren befinden (Bogendörfer; Oda; Rosenthal)[1].

## Zusammenfassung.

Kaninchen, die am Tage der intravenösen Immunisierung durch Diphtherie-Aluminium-Formol-Toxoid 3mal intravenös in 8stündigem Abstand mit einem Sympathicomimeticum (Ephedrin) behandelt wurden, wiesen 14 bzw. 32 Tage nach der Immunisierung einen wesentlich höheren Antitoxin-Titer auf als nichtbehandelte bzw. mit Pilocarpin behandelte Tiere. Die Unterschiede waren statistisch gut gesichert.

## Literatur.

Belák, S.: Klin. Wschr. **1939**, I, 472. — Bogendörfer, L.: 1. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **124**, 64 (1927); 2. **126**, 378 (1927); 3. **133**, 107 (1928). — Borneff, J., u. K. Lennert: Arch. f. Hyg. **133**, 285 (1950). — Campailla, G.: Dtsch. Z. Nervenheilk. **169**, 327 (1952). — Enenkel, H. J.: Dtsch. med. Wschr. **1955**, 155. — Fraser, D. T., and H. E. Wigham: J. Amer. Med. Assoc. **82**, 1114 (1924). — Frei, W.: Ärztl. Monatsh. (Bern) **1**, 70 (1945). — Gillissen, G.: Med. Klin. **1953**, 806. — Goreczky, L., u. G. Klinkhart: Z. Immun.forsch. **101**, 428 (1942). — Günther, O.: Z. Immun.forsch. **111**, 440 (1954). — Hoff, F.: Z. exper. Med. **67**, 615 (1929). — Holt, L. B.: Brit. J. Exper. Path. **32**, 157 (1951). — Jensen, C.: Intrakutane Kaninchenmethode. Kopenhagen: Levin & Munksgaard 1933. — Ipsen, J. jr.: J. of Immun. **69**, 273 (1953). — Loumos, S.: A.M.A. Arch. of Neurol. **68**, 69 (1952). — Oda, M.: J. Pediat. (Tokyo) **320**, 31 (1927); zit. J. exper. Med. **48**, 225 (1928). — Prigge, R.: 1. Arb. Staatl. Inst. exper. Ther. **32**, 1 (1935). — 2. Arb. a. d. Paul-Ehrlich-Institut **51**, 108 (1954). — 3. Memorandum des Sachverständigen-Komitees für biologische Standardisierung bei der Weltgesundheitsorganisation, WHO/BS/**275**, 275, Add. 1, 275 Add. 2. — Rosenthal, F., u. P. Holzer: Berl. klin. Wschr. **1921**, 675. — Salomonson, C. J., et T. Madsen: C. r. Acad. Sci. (Paris) **126**, 1229 (1898).

Dr. H. J. Enenkel, Staatl. Anstalt f. experimentelle Therapie, „Paul-Ehrlich-Institut", Frankfurt am Main.

[1] Herrn Diplom-Mathematiker W. Schulz danken wir für biometrische Hinweise und statistische Auswertung der Versuchsergebnisse. Fräulein G. Weissbäcker und Fräulein E. Poetzsch sind wir für gewissenhafte technische Mitarbeit dankbar.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 78—87 (1955).

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. H. Hellner).

# Der Einfluß der Milzexstirpation auf posttraumatische Veränderungen der Blutgerinnung und des Blutbildes bei der Ratte *.

Von

Leo Koslowski, Wilhelm Marggraf und Barbara Piper.

*(Eingegangen am 1. März 1955.)*

In einer früheren Mitteilung wurde über experimentelle Untersuchungen berichtet, die sich auf die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren, der Costa-Reaktion, des spezifischen Serumgewichtes, der Erythrocyten- und Leukocytenzahl und des weißen Blutbildes nach *Muskeltraumen* bei der Ratte erstreckten (Koslowski, Marggraf u. Weber).

Dabei konnten folgende Veränderungen als gesetzmäßige Folgen des Traumas nachgewiesen werden: Erhöhung der Gerinnungstendenz des Plasmas, Vermehrung des Profibrins, mehrwöchige Blutvolumenverminderung und ausgeprägte, langdauernde Leukopenie.

Während Eosinophilensturz und passagere Lymphopenie mit der Selyeschen Stress-Konzeption in Einklang zu bringen waren, mußten die Ursachen für die hochgradige Verminderung der Gesamtleukocytenzahl und insbesondere der Granulocyten außerhalb des Hypophysen-Nebennierenrinden (NNR)-Systems gesucht werden. Dabei war zunächst daran zu denken, daß die geschädigte, der Autolyse verfallene Muskulatur ein Massengrab für Leukocyten darstellt, die beim fermentativen Abbau der Muskelnekrosen verbraucht werden. Hierfür sprachen auch frühere morphologische Untersuchungen, bei denen in der autolytischen Muskulatur reichlich Leukocytentrümmer nachgewiesen wurden (Koslowski, 1951). Darüber hinaus war zu vermuten, daß in der Muskulatur Substanzen freiwerden, die eine Hemmung der Leukopoese bewirken.

Schließlich war der Einfluß der *Milz* auf das weiße Blutbild in Betracht zu ziehen, der bereits verschiedentlich untersucht und durch Exstirpation der Milz verhältnismäßig leicht zu prüfen ist.

---

* Herrn Professor Dr. Eduard Borchers zum 70. Geburtstag.

## Methodik.

An Ratten wurden nach operativer Entfernung der Milz geprüft:

1. Recalcifizierungszeit (RCZ); 2. Prothrombinzeit (PTZ) nach Lehmann-Quick; 3. Costa-Reaktion nach Seulberger, Kröning u. Marggraf; 4. Erythrocytenzahl; 5. weißes Differentialblutbild und Gesamtleukocytenzahl, einschließlich der Eosinophilenbestimmung nach Randolph.

Nähere Einzelheiten über die angewandten Laboratoriumsverfahren und über die Technik der Muskelschädigung wurden in der früheren Mitteilung bereits veröffentlicht.

Die RCZ ergab sich als Mittelwert aus 2—3, die PTZ aus 6 Messungen. Bei der Auswertung der Blutausstriche wurden mindestens 200 Zellen gezählt. Die Fehlerbreite wurde mit Hilfe der quadratischen Fehlerrechnung ermittelt. Ein großer Teil der Ergebnisse ließ sich statistisch sichern.

40 gesunde Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 150—200 g wurden als Versuchstiere verwendet. Als Futter dienten Küchenabfälle; Wasser wurde ad libitum gegeben.

Die *Splenektomie* wurde in Äthernarkose von einem medianen Oberbauchschnitt aus durchgeführt. Der Eingriff dauerte etwa 3 min. Zur Bekämpfung der latenten Barthonellen-Infektion, der Laboratoriumsratten, wie Lauda feststellte, nach Splenektomie häufig zu erliegen pflegen, erhielten sämtliche Tiere nach Angaben von Bücherl u. Schwab 3—5 mg Neo-Salvarsan intraperitoneal. Zwischen dieser Injektion und der Milzexstirpation lag ein Zeitraum von 3—10 Tagen.

Als konstant reproduzierbares Trauma wurde eine 6stündige Kompressions-Ischämie eines Hinterbeines gewählt. Dem Muskeltrauma wurden die Tiere 3 bis 4 Wochen nach der Splenektomie unterworfen, wenn sie völlig wiederhergestellt waren und ihre gewohnte Lebhaftigkeit wiedergewonnen hatten. 10 Tiere dienten als Kontrollen und wurden nur der Splenektomie, nicht aber dem Trauma unterworfen. Bei 3 Tieren wurde lediglich die Bauchhöhle eröffnet und wieder geschlossen.

## Ergebnisse.

Die Veränderungen der *Gerinnungsfaktoren* sind in Tab. 1 dargestellt. Bemerkenswert erscheint die erhebliche Verlängerung der RCZ 48 Std nach dem Trauma, die fast das Dreifache des prätraumatisch gemessenen Wertes erreicht. Die Schwankungen der PTZ tragen biphasischen Charakter und zeigen beim Vergleich mit der RCZ eher eine gegenläufige Tendenz. Immerhin weist auch die PTZ 22 Std nach dem Trauma eine deutliche Verlängerung auf.

Die Costa-*Reaktion* läßt eine ausgeprägte Beschleunigung erkennen, die in Ablauf und Intensität den in früheren Versuchen an normalen Ratten gefundenen Werten entspricht.

Die Reaktion des *roten* und *weißen Blutbildes* auf Splenektomie und Muskeltrauma sind in Tab. 2 wiedergegeben. Die Splenektomie führt zu einer Verminderung der Erythrocyten um 15—20% und der bekannten Leukocytose. Bis auf einen geringen Unterschied bei den Lymphocytenzahlen ergab sich völlige Übereinstimmung mit den von Bücherl u. Schwab mitgeteilten Werten. Das Muskeltrauma bewirkte einen Sturz der Gesamtleukocytenzahlen, der mit etwa 25% des Ausgangswertes 1 Woche nach dem Trauma seinen Tiefpunkt erreicht. Bei dieser

rückläufigen Leukocytenbewegung fällt eine Neigung zu vorübergehendem Wiederanstieg auf, der in zwei Gipfeln um die 13. und 48. Std nach dem Trauma den Ausgangswert fast erreicht.

Der Leukocytenschwund geht vornehmlich auf Kosten der Lymphocyten, deren Anteil an der Gesamtleukocytenzahl in den ersten 6 Std von 80% auf 50% sinkt, um dann kontinuierlich anzusteigen. Der Quotient Granulocyten/Lymphocyten erhöht sich von 0,3 auf 0,9 und unterschreitet nach 8 Wochen die Norm.

Die *Eosinophilen* sinken von 410/mm³ innerhalb von 6 Std auf 27/mm³. Sie zeigen um die 13. und 48. Std im Rahmen der beiden Gesamtleukocyten-Gipfel einen Anstieg, wobei nach 48 Std der Ausgangswert nahezu erreicht wird. Selbst 3 und 8 Wochen nach dem Trauma liegen die Eosinophilen mit 40—60/mm³ außerordentlich niedrig. Dies ist um so auffallender, als zwar bei Tieren mit bloßer Bauchhöhlen-Eröffnung 22 Std nach dem Muskeltrauma ebenfalls ein ausgeprägter Eosinophilensturz auf etwa $^1/_{10}$ des Ausgangswertes erfolgt, hingegen 3 Wochen nach Splenektomie ohne Trauma der Normalwert nicht nur erreicht, sondern um das 3—4fache überschritten ist. Da nach 8 Wochen von einer „stress"-Situation keine Rede mehr sein kann, die Ratten vielmehr zu diesem Zeitpunkt völlig gesund und munter sind, muß die Senkung der Eosinophilen-Zahl dann andere Gründe als eine Aktivitätssteigerung der NNR haben.

Tabelle 1. *Gerinnungszeiten nach Splenektomie und Muskeltrauma.*

| | Zahl der Tiere | Recalzifizierungszeit (sec) | Prothrombinzeit (sec) | Costa-Reaktion (sec) |
|---|---|---|---|---|
| Normaltiere . . . . | 21 | 119,4 ± 7,65 | 17,1 ± 0,30 | 900 ± 139,0 |
| Splenekt. Tiere ohne Muskeltrauma . . . | 10 | 62,7 ± 3,98 | 17,8 ± 0,38 | 804 ± 55,6 |
| Splenektomierte Tiere mit Muskeltrauma: 1 Std . . . | 4 | 71,1 ± 4,37 | 17,9 ± 0,53 | 822,5 ± 191,1 |
| 6 Std . . . | 6 | 83,3 ± 10,36 | 17,3 ± 1,73 | 53,3 ± 18,87 |
| 13 Std . . . | 6 | 92,5 ± 10,57 | 15,7 ± 0,24 | 31,6 ± 6,78 |
| 22 Std . . . | 6 | 112,5 ± 7,57 | 22,9 ± 0,85 | 29,0 ± 1,83 |
| 48 Std . . . | 6 | 179,5 ± 17,82 | 14,4 ± 5,81 | 42,2 ± 13,1 |
| 1 Woche . | 5 | 91,3 ± 17,64 | 19,7 ± 0,68 | 333 ± 161,3 |
| 3 Wochen . | 4 | 79,9 ± 1,55 | 19,4 ± 0,59 | 340 ± 189,2 |
| 8 Wochen . | 3 | 83,0 ± 1,52 | 19,8 ± 0,32 | 726 ± 63,59 |
| Lapar. Tiere ohne Splenektomie 22 Std . . . . . | 3 | 116,0 ± 4,91 | 20,8 ± 0,86 | 21 ± 1,35 |

Im *lymphocytären* Differentialbild treten vorübergehend, und zwar besonders um die 13. und 48. Std nach dem Trauma jugendliche Zellen auf, während die großen Lymphocyten eine Verminderung auf etwa die

Hälfte erfahren. Im *granulocytären* Bild sind wesentliche Verschiebungen nicht erkennbar, allenfalls läßt sich eine leichte Übersegmentierung beobachten.

*Vergleich der Traumafolgen bei normalen und splenektomierten Ratten.*

*a) Gerinnungszeiten.* Während die RCZ normalerweise nach dem Trauma eine Verkürzung um 50% erfährt, kommt es bei milzlosen Tieren zu einer erheblichen Verlängerung, die ihr Maximum nach 48 Std erreicht. Die beiden RCZ-Kurven bieten einen fast spiegelbildlichen Verlauf.

Die PTZ ist zunächst verkürzt, nach 22 Std aber deutlich verlängert und zeigt ein erneutes Minimum nach 48 Std, also während des RCZ-Maximums. PTZ- und RCZ-Kurve verlaufen bei Normaltieren parallel, bei splenektomierten Ratten aber in spiegelbildlichem Gegensatz, während die COSTA-Reaktion nach Splenektomie keine Änderung ihres posttraumatischen Ablaufs erkennen läßt.

*b) Erythrocyten.* Die Zahl der roten Blutkörperchen steigt bei den milzlosen Tieren während der initialen posttraumatischen Hämokonzentration stärker an, bietet sonst aber keine wesentlichen Abweichungen gegenüber den Normaltieren, wenn man von der nach Splenektomie zunächst vorhandenen Anämie absieht.

*c) Leukocyten.* Bei den weißen Blutkörperchen springt die wellenförmige Kurve nach der Milzexstirpation im Gegensatz zur gleichmäßig abfallenden Zellzahl bei den Normaltieren ins Auge. Diese Schwankungen betreffen Granulocyten und Lymphocyten in gleicher Weise. Die Eosinophilen stürzen von höherer Ausgangslage auf die Tiefstwerte der Normaltiere ab, erreichen jedoch zur 48. Std in einem vorübergehenden Anstieg fast den Ausgangswert. Danach bleibt die Verminderung auf 10—15% des Ausgangswertes bis zum Ablauf der 8. Woche bestehen.

## Besprechung der Ergebnisse.

Als überraschendes und interessantestes Ergebnis darf wohl das gegensätzliche Verhalten der Gerinnungstendenz nach einem Muskeltrauma gewertet werden, je nachdem, ob dieses ein im Besitz seiner Milz befindliches oder aber ein milzloses Tier getroffen hat.

In der früheren Mitteilung wurde die Verkürzung der RCZ und PTZ nach dem Muskeltrauma als Zeichen einer Vermehrung der Prothrombin- und Accelerator-Substanzen und als Ausdruck einer Erhöhung des Gerinnungsgesamtpotentials bei Histaminämie gewertet; denn der Bluthistaminspiegel erreichte in den ersten 24 Std nach dem Trauma extrem hohe Werte (KOSLOWSKI, MARGGRAF u. SCHEELE). Darüber hinaus schien die RCZ-Verkürzung in besonderem Maße durch die vermehrte Profibrinbildung bedingt, die in der starken Beschleunigung der COSTA-Reaktion zum Ausdruck kommt — eine Vermutung, die durch die vorliegenden Versuchsergebnisse in Frage gestellt werden könnte. Es ist aber bekannt, daß nach vermehrtem Auftreten körpereigener Antikoagulantien (Heparin-Antithrombinfaktoren MARGGRAF), sowie überhaupt bei der Antikoagulantientherapie der

gerinnungsverkürzende Effekt einer Fibrinogen-Vermehrung bzw. Profibrinbildung bzw. Profibrinvermehrung ausgeglichen oder gar „überkompensiert" wird. Dies zeigt sich besonders nach Anwendung von Heparin zur Thrombose-Prophylaxe bzw. -Therapie. Möglicherweise gelangt posttraumatisch bei splenektomierten Ratten ein körpereigener gerinnungshemmender Faktor (ein Antithrombin) in den Kreislauf, der die erhebliche Verzögerung der RCZ bewirkt.

Da die PTZ unverändert oder sogar verkürzt ist, kommt eine Verminderung der im Prothrombinkomplex erfaßten Faktoren als Ursache der RCZ-Verlängerung kaum in Betracht. Der Fibrinogen- bzw. Profibrin-Anteil ist gleichfalls vermehrt; somit fällt auch eine Mitwirkung dieser Substanzen bei der beobachteten Gerinnungszeitverlängerung aus. Den Thrombocyten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnten, dürfte keine entscheidende Bedeutung bei der Änderung der Gerinnungstendenz zukommen, da eine Milzexstirpation bei gesunden Individuen keine wesentlichen Änderungen im Thrombocytenhaushalt auslöst (Schulten). Die weitere Differenzierung der Gerinnungsfaktoren im Hinblick auf das Verhalten der Heparin-Progressiv-Antithrombin-Komponente wird zur Zeit bearbeitet (Marggraf).

Bluthistaminbestimmungen an splenektomierten Ratten wurden nicht durchgeführt, so daß offenbleiben muß, ob die posttraumatische Histaminämie nach der Milzexstirpation ausbleibt. Dies ist wenig wahrscheinlich, da das nachgewiesene Histamin kaum aus der Milz, sondern aus dem geschädigten Muskel stammt. Ein Histamineffekt ließe sich allenfalls aus dem Verhalten der PTZ und der Costa-Reaktion ableiten, von denen die erstere 13 Std nach dem Trauma, d. h. zum Höhepunkt der Histaminämie, mit 15,7 sec eine deutliche Verkürzung erkennen läßt. Danach zeigt sie biphasisches Verhalten. Die Costa-Reaktion scheint in ihrem posttraumatischen Ablauf durch die Splenektomie nicht beeinflußt zu werden. Die Verlängerung der RCZ erfolgt nahezu linear, während ihre Verkürzung beim Normaltier nach 22 Std immerhin einen leichten Rückgang aufwies. *Mithin scheint die Entfernung der Milz gerinnungshemmende Einflüsse zur Geltung zu bringen, die erst in der posttraumatischen „stress-Situation" wirksam werden und trotz Vermehrung des Prothrombins und Profibrins zu einer deutlichen Verzögerung der Gerinnung führen.*

Diese Feststellung ist um so beachtlicher, als eine *erhöhte Gerinnungsneigung* stets als gesetzmäßige Folge schwerer Muskeltraumen und der dabei erfolgenden Freisetzung von Autolyseprodukten („Frühgiften" Dyckerhoff, Lenggenhager) gegolten hat.

An dieser Stelle scheinen auch Beobachtungen von Ungar über die Beziehungen zwischen Hypophysen-NNR-System und Milz erwähnenswert: Ungar fand bei Meerschweinchen und Ratten nach Traumen eine erhebliche Verkürzung der Blutungszeit, also eine Erhöhung der Gerinnungstendenz, die aber ausblieb, wenn

entweder Hypophyse bzw. Nebennieren oder aber die Milz entfernt wurden. Er schloß daraus, daß die Verkürzung der Blutungszeit durch ACTH- oder Cortison-Ausschüttung vom Vorhandensein eines *Milzwirkstoffes* abhängt, den er *Splenin* nannte. In anderem Zusammenhang hat Weissbecher die Vermutung ausgesprochen, daß ACTH von Heparin unter Mitwirkung eines noch unbekannten, im Plasma enthaltenen Faktors inaktiviert werde. Die vorliegenden Ergebnisse können als Stütze für Ungars Hypothese gelten; ist doch die geradezu paradoxe posttraumatische Gerinnungsverzögerung bei milzlosen Tieren kaum anders als mit dem Fortfall eines humoralen Faktors zu erklären, der entweder in der Milz selbst gebildet oder von ihr in seiner Wirkung gesteuert wird. *Diese Wirkung offenbart sich erst im Augenblick der Belastung.*

Die Beobachtung, daß splenektomierte Ratten nach dem Trauma eine höhere Mortalität als Normaltiere aufweisen, stimmt mit den klinischen Feststellungen von de Franciscis u. Guidetti über die herabgesetzte Resistenz splenektomierter jugendlicher gesunder Menschen gegen Sauerstoffmangel gut überein.

Bei diesen Erwägungen läßt sich auch an die Untersuchungen von Rein u. Mitarb. zur Frage des sogenannten *Hypoxie-Lienins* denken. Wird doch dieser Stoff offenbar auch nur unter besonderen Belastungen freigesetzt, und zwar — über eine Erregung der Milznerven — vor allem durch $O_2$-Mangel und Milchsäure (H. Rein).

Ohne die offenen Probleme des Hypoxie-Lienins weiter zu erörtern, mag hier die Frage aufgeworfen werden, ob die beobachtete Umkehrung der Gerinnungstendenz nach Traumatisierung milzloser Tiere etwa auch auf veränderte Regulationen der *Leber* infolge Störung des Milz-Leber-Systems zurückzuführen sei.

### *Weißes Blutbild.*

In Übereinstimmung mit Palmer u. Mitarb. sowie Bücherl u. Schwab läßt sich eine statistisch gesicherte Vermehrung der neutrophilen und eosinophilen Granulocyten sowie der Lymphocyten als Folge der Milzexstirpation nachweisen. Die Zahl der Eosinophilen pro $mm^3$ Blut liegt etwas tiefer als bei den eben erwähnten Autoren, da die Zählung nicht nach Dunger-Recant, sondern nach Randolph erfolgte.

Die nach dem Trauma zu beobachtende Granulo- und Lymphocytopenie prägt sich zwar auch bei splenektomierten Tieren bereits in den ersten 6 Std in einem Abfall auf 50% aus, doch kommt es in den ersten 48 Std zu deutlichen rhythmischen Schwankungen, die für die posttraumatischen Leukocytenveränderungen bei splenektomierten Tieren charakteristisch zu sein scheinen. Diese Schwankungen betreffen vor allem die Gesamtleukocytenzahl, die Neutrophilen und die Lymphocyten, in geringerem Maße auch die Eosinophilen. Bemerkenswert scheint hierbei das synchrone Zusammentreffen sowohl der beiden Leukocyten-Maxima mit den PTZ-Minima zur 13. und 48. Std, als auch — um die 22. Std — die Gleichzeitigkeit des Leukocytenminimums mit dem PTZ-Maximum, bei Normaltieren überdies mit einem Anstieg der RCZ.

Tabelle 2. *Rotes und weißes Blutbild nach*

| | Zahl der Tiere | Erythrocyten Mill. mm³ | Gesamt-Leukocyten mm³ | Granulocyten mm³ | Lymphocyten mm³ | Eosinophile mm³ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Normal-Tiere | 21 | 7,46 ± 0,62 | 10000 ± 2700 | 2500 ± 900 | 7500 ± 450 | 130 ± 18,0 |
| Splenekt. Tiere O.M. | 10 | 4,67 ± 0,61 | 23815 ± 2711 | 4830 ± 965 | 18800 ± 2142 | 410 ± 54,1 |
| 1 Std | 4 | 6,97 ± 0,13 | 10125 ± 1045 | 4120 ± 450 | 6020 ± 455 | 54,25 ± 7,1 |
| 6 Std | 6 | 6,11 ± 0,38 | 10525 ± 3842 | 5150 ± 952 | 5375 ± 960 | 27 ± 7,1 |
| 13 Std | 6 | 6,04 ± 0,73 | 24120 ± 3103 | 9420 ± 1490 | 14700 ± 1470 | 167 ± 21,3 |
| 22 Std | 6 | 6,47 ± 0,31 | 7300 ± 844 | 2410 ± 383 | 4890 ± 380 | 54,8 ± 16,2 |
| 48 Std | 6 | 6,15 ± 0,37 | 19104 ± 406 | 6300 ± 920 | 12804 ± 900 | 374,3 ± 109 |
| 1 Wo. | 5 | 5,11 ± 0,28 | 5440 ± 942 | 1410 ± 281 | 4030 ± 284 | 56 ± 15,8 |
| 3 Wo. | 4 | 4,57 ± 0,61 | 4510 ± 957 | 1210 ± 106 | 3300 ± 107 | 44 ± 25,3 |
| 8 Wo. | 3 | 8,31 ± 0,62 | 11950 ± 2898 | 2150 ± 600 | 9800 ± 625 | 60 ± 3,46 |
| Laparat. Tiere O.Sp. 22 Std | 3 | 6,41 ± 0,70 | 4300 ± 728 | 3180 ± 286 | 1120 ± 300 | 10 ± 5,5 |

O.M. ohne Muskeltrauma; O.Sp. ohne Splenektomie.

Im Hinblick auf die bekannten Wirkungen von *ACTH* und *Cortison* auf das weiße Blutbild liegt es nahe, das Hypophysen-NNR-System mit den Leucocyten- und Gerinnungszeitschwankungen in Verbindung zu bringen. Schon Bücherl u. Schwab prüften die Frage, ob die nach Splenektomie auftretende Vermehrung der Leukocyten, insbesondere auch der Eosinophilen, auf einer Hemmung der NNR-Funktion im Sinne der Ungarschen Hypothese beruhe. Sie injizierten ACTH intraperitoneal und fanden es bei splenektomierten Tieren genau so wirksam wie bei Normaltieren.

Die Veränderungen des weißen Blutbildes in den vorliegenden Versuchen wird man jedoch nur zum Teil auf die Wirkung von körpereigenem ACTH bzw. Cortison zurückführen dürfen; spricht doch hiergegen vor allem die drastische Verminderung der Gesamtleukocytenzahl. Wie bereits erwähnt, machen histologische Beobachtungen es wahrscheinlich, daß zahlreiche Leukocyten in die geschädigte Muskulatur emigrieren, um dort an der Autolyse mitzuwirken. Immerhin wird aus Tab. 2 ersichtlich, daß in erster Linie die stark vermehrten Lymphocyten schwinden, während die Granulocyten an den beiden bereits erwähnten Zahlengipfeln zur 13. und 48. Std den Ausgangswert sogar erheblich überschreiten.

Des weiteren läßt sich erkennen, daß die Eosinophilen trotz ihrer auf das 3—4fache des Normalen erhöhten Ausgangszahl auf die gleichen Tiefstwerte absinken wie bei Normaltieren.

*plenektomie und Muskeltrauma.*

| Basophile | Eosinophile | Stab. | Seg. | % Granulocyten | % Lymphocyten | % Granulocyt. / % Lymphocyt. | Jgdl. Lymphocyten | Große Lymphocyten | Kleine Lymphocyten | Rieder-Form | Monocyten |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 1,3 ± 0,1 | 2,9 | 20,6 | 25,0 ± 5,0 | 75,0 ± 4,0 | 0,3 ± 0,08 | — | 14,9 | 57,1 | 2,1 | 0,3 |
| – | 1,7 ± 0,2 | 2,1 | 18,15 | 20,4 ± 4,07 | 78,95 ± 4,31 | 0,26 ± 0,07 | — | 13,3 | 62 | 3 | 0,7 |
| – | 0,5 ± 0,07 | 2,1 | 38 | 40,6 ± 4,44 | 59,4 ± 4,39 | 0,68 ± 0,15 | 1,1 | 5,1 | 50,3 | 2 | 0,5 |
| – | 0,25 ± 0,06 | 2,1 | 46,9 | 49,2 ± 9,16 | 50,8 ± 9,16 | 0,97 ± 0,45 | 0,4 | 7,1 | 40,9 | 1,5 | 0,4 |
| – | 0,69 ± 0,08 | 3,6 | 35,2 | 39,4 ± 6,18 | 60,6 ± 6,18 | 0,65 ± 0,19 | 3 | 9 | 45 | 1,7 | 1,9 |
| – | 0,75 ± 0,22 | 0,5 | 31,8 | 33 ± 5,09 | 67 ± 5,17 | 0,49 ± 0,10 | 0,1 | 2,5 | 63,3 | 1 | 0,1 |
| 3 | 1,96 ± 0,56 | 3,4 | 27,4 | 32,9 ± 4,64 | 67,08 ± 4,72 | 0,49 ± 0,12 | 3,5 | 7 | 46 | 9,5 | 1 |
| – | 1,03 ± 0,29 | 0,4 | 24,6 | 26 ± 5,21 | 74 ± 7,2 | 0,35 ± 0,09 | 1,2 | 7,2 | 58,2 | 7 | 0,4 |
| 2 | 0,97 ± 0,55 | 1,8 | 24,1 | 27 ± 2,38 | 73 ± 2,38 | 0,37 ± 0,04 | — | 4 | 68,5 | 0,5 | — |
| – | 0,51 ± 0,09 | 0,1 | 16,4 | 17 ± 5,04 | 83 ± 5,08 | 0,21 ± 0,07 | — | 7,3 | 72,7 | 3 | — |
| – | 0,23 ± 0,16 | 0,5 | 73,3 | 74 ± 6,69 | 26 ± 6,7 | 2,83 ± 1,36 | 0,3 | 7,5 | 17,9 | 0,3 | — |

Bierman u. Mitarb. diskutierten im Rahmen von Untersuchungen über die Wirkung intravenöser Histamin-Injektionen auf den Leukocytengehalt des Blutes die Möglichkeit einer Leukocytensperre in der Lunge unter dem Einfluß vasoconstrictorisch wirkender Substanzen. Doch sind von diesem Mechanismus fast ausschließlich die Granulocyten betroffen, so daß er bei der Leukopenie nach Splenektomie und Trauma ursächlich kaum in Betracht kommt. Vaughn macht sich die Hypothese von Code zu eigen, wonach die Eosinophilen Histamin und andere toxische Stoffwechselprodukte — aus dem Knochenmark oder aus Gewebszerfallsherden — in die Lungen oder in den Dünndarm transportieren sollen, wo sie mitsamt ihrer schädlichen Fracht ausgeschieden würden. Der Rest werde in der Milz zerstört. Diese Konzeption soll für das unter den verschiedensten Bedingungen auftretende Phänomen der Eosinophilie eine einheitliche Erklärung liefern. Die Eosinophilie nach Splenektomie wäre also durch den Ausfall des Eosinophilen-Abbaus in der Milz bedingt. Es wäre wünschenswert, diesen Vorstellungen, die Vaughn durch Injektionen von Histaminphosphat und Ascariden-Total-Extrakt nebst anschließender histologischer Untersuchung von Lungen, Hiluslymphknoten, Bronchus, Dünndarm, Milz und parietalem Peritoneum zu stützen versucht, experimentell nachzugehen, zumal sie möglicherweise mit den „intrapulmonalen Verbrennungen" von Mertens u. Rein in Verbindung gebracht werden könnten.

Die Veränderungen des weißen Blutbildes nach Traumatisierung splenektomierter Ratten lassen gegenüber den Normaltieren eine erhöhte Labilität der Regulationsabläufe mit biphasischen Schwankungen der Zellzahlen und eine Abschwächung des posttraumatischen Lymphocytensturzes erkennen. Der synchrone Ablauf der Gerinnungsschwankungen und der Blutzellveränderungen läßt darauf schließen, daß eine

einheitliche Steuerung beider Systeme, wohl unter wesentlicher Mitwirkung des vegetativen Nervensystems, vorliegt. Diese Annahme stimmt mit der von Schliephake vertretenen Auffassung überein, daß die Milz im Rahmen des vegetativen Systems ein Regulationsorgan darstellt, mit dessen Hilfe überschießende Reaktionen abgebremst und ausgeglichen werden.

Muskelzerfallsprodukte, NNR-Hormone und das Fehlen von Wirkstoffen der Milz, wie Bernard u. Mathe sie für die Hemmung der Leukopoese im Milzvenenblut experimentell nachwiesen, kommen als kausale Faktoren für die beobachteten Reaktionen in Frage. Ihr Zusammenwirken hebt die Homoeostase des Blutbildes und des Gerinnungspotentials auf, so daß ein rhythmisches Auf und Ab der Zellzahlen und Gerinnungszeiten in Erscheinung tritt.

## Zusammenfassung.

Es wird über den Einfluß der Milzexstirpation auf den Ablauf posttraumatischer Veränderungen berichtet.

Die Entfernung der Milz hat zunächst die bekannte Vermehrung der Leukocytenzahlen und eine deutliche Steigerung der Gerinnungstendenz des Blutes mit Verkürzung der Gerinnungszeit zur Folge.

Nach einer mehrstündigen Kompressions-Ischämie der Muskulatur eines Hinterbeines läßt sich eine drastische Verminderung der Gerinnungsneigung mit erheblicher Verlängerung der Gerinnungszeit nachweisen.

Die auch beim Normaltier zu beobachtende posttraumatische Leukopenie ist nach Splenektomie weniger ausgeprägt und weist Schwankungen von offenbar gesetzmäßigem Ablauf auf, synchron mit den Schwankungen der Gerinnungszeiten.

Die Veränderungen der Gerinnungstendenz und der Blutzellzahlen werden auf das Zusammenwirken von Muskelautolyse-Produkten, NNR-Hormonen und unbekannten Wirkstoffen aus der Milz zurückgeführt.

## Literatur.

Bernard, J., u. G. Mathe: Vortrag auf dem Milz-Symposion Innsbruck, Sept. 1954. — Bierman, H. R., R. L. Byron jr., K. H. Kelly, F. Cordes, L. P. White and A. Whitman: Blood **8**, 315 (1953). — Bücherl, E., u. M. Schwab: Klin. Wschr. **1951**, 731. — Carlström, B.: Skand. arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **61**, 159 (1931); **62**, 1 (1932). — Code, C. F.: Physiologic. Rev. **32**, 47 (1952), zit. nach Vaughn. — Dunger, R.: Münch. med. Wschr. **1912**, 1942. — Dyckerhoff, K.: Beitr. path. Anat. **103**, 245 (1939). — Franciscis, P. de, et B. Guidetti: Progresso medico **3**, 293 (1947). — Koslowski, L.: Zbl. Path. **87**, 49 (1951). — Koslowski, L., W. Marggraf u. W. Scheele: Klin. Wschr. **1952**, 365. — Koslowski, L., W. Magrggraf u. D. Weber: Klin. Wschr. **1953**, 81. — Lauda, E.: Klin.

Wschr. **1925**, II, 1587. — Lenggenhager: Mitt. Grenzgeb. Med. und Chir. **44**, 75 (1935—37). — Marggraf, W.: (im Druck). — Mertens, O. u. H., Rein: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **1945**, 91. — Palmer, I. G., I. Kemp, E. G. Cartwright a. M. N. Wintrope: Blood **6**, 3 (1951). — Randolph. T. B. J. Allergy **15**, 89 (1944). — Recant, L., D. M. Hume, P. H. Forsham a. G. W. Thorn: J. Clin. Endocrin. **10**, 187 (1950)[8] — Rehn, J.: Langenbecks Arch. u. Dtsch. Z. Chir. **278**, 229 (1954). — Rein, H.: Naturwissenschaften **36**, 233 (1949). — Schulten, H.: Lehrb. d. klin. Hämatologie. Stuttgart 1948. — Schliephake, E.: Wien. med. Wschr. **1952**, 880. — Seulberger, P., F. Kröning u. W. Marggraf: Bruns Beitr. **180** (1950). — Ungar, G.: Endocrinology **37**, 329 (1945). — Vaughn, J.: Blood **8**, 1 (1953). — Weissbecher, L.: zit. nach J. Rehn.

Dr. L. Koslowski, Göttingen, Chirurg. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 88—97 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

# Die Wirkung von Acetylcholin, Dekamethonium und d-Tubocurarin am isolierten Rattenzwerchfell in Abhängigkeit von der Denervationsdauer.

Von

Erich Muscholl und Heinz Lüllmann.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 20. Januar 1955.)*

Das Zwerchfell der Ratte weist im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Skeletmuskeln (Übersicht bei Tower) nach Denervierung eine echte Hypertrophie auf. Dies wurde von Martin u. Sola zuerst beschrieben und später an einem größeren Tiermaterial statistisch einwandfrei gesichert (Sola u. Martin).

Nach intrathorakaler einseitiger Phrenicusdurchtrennung steigt das Gewicht der denervierten Zwerchfellhälfte einige Tage nach der Operation gegenüber dem Gewicht der gleichseitigen Diaphragmahälften unbehandelter Kontrolltiere an. 6—8 Tage nach Denervierung beträgt die Gewichtsteigerung 20—55%. In der darauf folgenden Zeit geht das Ausmaß der Hypertrophie zurück, bis nach 23—38 Tagen die Gewichte normaler und denervierter Zwerchfelle gleich sind. Dann erst setzt eine Atrophie ein, die bis zu einem 60%igen Gewichtsverlust des chronisch denervierten Muskels führt.

Eine Reihe von Erscheinungen am denervierten Skeletmuskel (Fibrillationen s. Tower; Levine, Hechter u. Soskin, Acetylcholin-(Ach-) Empfindlichkeit Knowlton u. Hines) wurde mit der Atrophie in zeitlichen oder kausalen Zusammenhang gebracht. Eine Untersuchung am denervierten Zwerchfell erschien daher deswegen lohnend, weil an diesem Präparat die erwähnten Erscheinungen erst in späteren Denervationsstadien auftreten müßten, wenn ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Fibrillationen bzw. Ach-Empfindlichkeit einerseits und der Atrophie andererseits gegeben wäre.

Die Entwicklung der Ach-Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Denervationsdauer wurde an Muskeln in situ von Frank, Nothmann u. Hirsch-Kaufmann; Brown; Rosenblueth u. Luco; Knowlton u. Hines sowie Reid u. Vaughan Williams geprüft. Uns sind keine entsprechenden Untersuchungen an einem isolierten Muskelpräparat bekannt, obwohl Einzelbefunde über den Einfluß von Ach, Dekamethonium (C 10), d-Tubocurarin (dTc) und anderen Pharmaka zu bestimmten Denervationsstadien, meist ab 10. Tag, von verschiedener Seite

vorliegen: Am Rattenzwerchfell: Haydu, Knox u. McDowall; McDowall u. Watson; McDowall, Montagu u. Watson; Hall u. Knox; am Katzenzwerchfell: Dale u. Gaddum; am M. serratus der Ratte: Lüllmann u. Brunner.

In der vorliegenden Arbeit wurde gleichzeitig mit der Wirkung von Ach zu verschiedenen Zeitpunkten nach Denervation der Einfluß von dTc und C 10 untersucht.

## Methodik.

Für die Untersuchung wurden 41 überwiegend männliche Albinoratten (120 bis 180 g) verwendet. Die Denervation der Zwerchfellhälften erfolgte in der früher beschriebenen Weise (Lüllmann u. Muscholl) durch einseitige Phrenicusexhärese. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Denervierung wurden die isolierten Diaphragmahälften in der Anordnung nach Bülbring untersucht. Als Badflüssigkeit diente Tyrodelösung (8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g $CaCl_2$; 0,1 g $MgCl_2$; 1,0 g $NaHCO_3$; 0,05 g $NaH_2PO_4$; 2,0 g Glucose; Aqua dest. ad 1000 ml), die mit $O_2$ oder 95% $O_2$ + 5% $CO_2$ durchperlt wurde. Die Temperatur des Bades betrug 38° C. Die Reizung erfolgte direkt oder indirekt (über den peripheren Phrenicusstumpf in den ersten Tagen nach der Denervation) durch Rechteckimpulse von 2 ms Dauer und einer Frequenz von 0,25 Hz. Der Stromfluß betrug bei Reizung im Bad 70 mA. Die Kontraktionen wurden auf dem Rußkymographion isotonisch oder „halbisometrisch" registriert. Wir verwendeten folgende Substanzen[1]: Acetylcholin. hydrochl.; Bis-trimethylammoniumdekamethylen-dijodid und d-Tubocurarinchlorid.

## Versuchsergebnisse.

Das isolierte Diaphragma war 6 und 8 Std nach der Phrenicusexhärese durch elektrische Reizung des peripheren Nervenstumpfes erregbar. Nach 18 und mehr Std trat keine indirekt auslösbare Zuckung mehr auf. Fibrillationen konnten nach der Denervierung vom 2. Tag an in situ beobachtet werden. Die spontane Aktivität sistierte jedoch bei Kontakt des Muskels mit der Badflüssigkeit.

Die nachfolgend beschriebenen Effekte wurden sowohl bei isotonischer als auch bei „halbisometrischer" Registrierung erhalten. Bei einer Vorspannung von 5 g entwickelten die Zwerchfellhälften nach elektrischem Einzelreiz von Beginn der Denervation bis 1 Monat danach 5 bis 10 g Spannung. Dann erfolgte eine stärkere Abnahme der Kontraktionskraft, so daß vom 2. Monat ab die Zuckungsspannung weniger als 5 g betrug.

**1. Die Wirkung von Acetylcholin.** Der Einfluß von Ach auf das isolierte Zwerchfell wurde 6, 8, 18, 24 und 48 Std. 3, 4, 5, 6, 8, 13, 15, 21, 22, 23, 27 und 28 Tage, 7, 8, 9, 10 und 11 Wochen sowie 5, 6 und 12 Monate nach der Denervierung untersucht. Die Ach-Wirkung äußerte sich in drei verschiedenen Erscheinungsbildern, die getrennt betrachtet werden sollen: Kontraktur, Kontrakturrückstand und Verminderung der Hubhöhe der elektrisch ausgelösten Zuckung.

[1] Wir danken der Firma Hoffmann La Roche, Grenzach/Baden, für die Überlassung von Ach, der Firma Asta, Brackwede, für dTc sowie den Cassella-Farbwerken, Frankfurt/M., für Versuchsmengen von C 10.

*a*) *Kontraktur.* Von drei Zwerchfellhälften, die 48 Std. nach Denervation untersucht wurden, zeigten zwei nach Gabe von Ach ($1:10^4$) eine leichte Kontraktur; die Verkürzung betrug dabei 10—20% der Zuckung, die durch direkten elektrischen Reiz vor Gabe des Ach ausgelöst wurde, und dauerte etwa 20 sec (Abb. 1a). In den folgenden Denervationsstadien erhöhte sich die Empfindlichkeit des Muskels gegenüber Ach beträchtlich: Um eine Kontraktur auszulösen, die etwa 80% der durch elektrische Reizung erhaltenen Zuckung betrug, benötigten wir nach einer Woche eine Ach-Konzentration von $1:10^5$, nach 2 Wochen $1:10^6$ (Abb. 1b u. c).

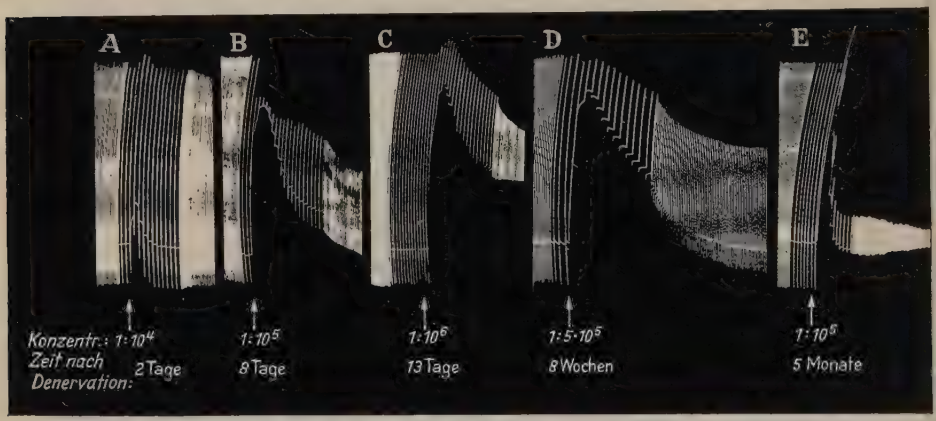



Abb. 1. Wirkung von Ach auf das denervierte Rattenzwerchfell. Reizung direkt, Frequenz 0,25 Hz, Impulsdauer 2 ms. Verhältnis der zwei Laufgeschwindigkeiten der Rußtrommel = 1:6. Registrierung isotonisch (*b*, *d*, *e*) bzw. „halbisometrisch" (*a*, *c*). ↑ = Gabe von Ach.

Die Dauer der Kontraktur nahm während der Periode der Empfindlichkeitssteigerung ebenfalls zu (s. u.). Während der 2. bis 4. Woche nach Phrenicusexhärese zeigten die Zwerchfelle bei Ach-Gabe etwa gleichartige Reaktionen. Dann verringerte sich die Empfindlichkeit gegenüber Ach zwar wieder etwas, blieb aber während der Beobachtungszeit noch so hoch, daß für eine Kontraktur von 80—100% der elektrisch ausgelösten Zuckungshöhe Dosen von $1:10^5$ und weniger benötigt wurden (Abb. 1d u. e).

*b*) *Kontraktur-Rückstand.* Die Dauer der Kontraktur war 2 und 3 Tage nach der Denervation kurz. Schon nach 30 sec nahm der Hebel wieder die Ruhelage ein. Vom 4. Tag an hielt die Kontraktur mehrere Minuten an, wobei weniger die Verkürzungs- und unmittelbar anschließende Erschlaffungsphase verlängert waren, als vornehmlich der letzte Teil der Erschlaffung. Diese Erscheinung wird im folgenden als Kontraktur-Rückstand bezeichnet. Seine Größe (1, 3 u. 6 min nach Gabe von Ach gemessen) war abhängig von der Denervationsdauer (Abb. 2). Der Auswertung wurden Kontrakturen gleicher Höhe zugrunde gelegt. Das

Maximum des Rückstandes war nach einem Monat erreicht. Er verringerte sich dann soweit, daß bei den späteren Denervationsstadien (2, 6 u. 12 Monate) auf Zusatz von Ach nur eine kurzdauernde Kontraktur (30 sec) ohne einen Rückstand auftrat, wie in den ersten Tagen nach Phrenicusexhärese (s. auch Abb. 1).

c) *Verminderung der Hubhöhe.* In den ersten Stunden nach Denervierung beeinflußte Ach ($1:10^4$) die Höhe elektrisch ausgelöster Kontraktionen nicht. Nach 48 Std jedoch trat gleichzeitig mit dem Beginn der Ach-Kontraktur eine Verminderung der Hubhöhe auf. Am 5. Tag

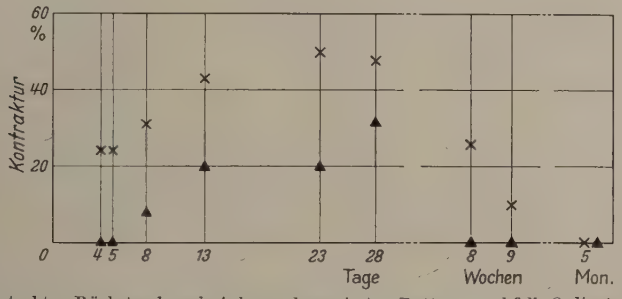



Abb. 2. Kontraktur-Rückstand nach Ach am denervierten Rattenzwerchfell. *Ordinate*: Ausmaß der Kontraktur in % der Höhe der Einzelzuckung (elektrisch ausgelöst, vor der Ach-Gabe gemessen) 1 min (×) und 6 min (▲) nach Ach.
*Abszisse*: Zeit nach Exhärese des N. phrenicus. Einzelheiten siehe Text.

nach Denervation benötigten wir Ach-Konzentrationen von $1:10^1$, um die Kontraktionshöhe auf 20% des Ausgangswertes zu senken. Der gleiche Effekt ließ sich nach zweiwöchiger Denervierung mit Ach $= 1:10^6$ erzielen. Diese Steigerung der Empfindlichkeit der Zuckungshöhe gegenüber Ach fand aber dann einen Abschluß, da auch bei länger denervierten Zwerchfellen keine stärkere Depression der Hubhöhe mehr gesehen wurde. In allen Stadien der Denervation war die Schwelle für die Verminderung der Kontraktionshöhe niedriger als die zur Auslösung der Kontraktur.

Jeder der beschriebenen Ach-Effekte war reproduzierbar, wenn das Ach durch mehrmaligen Wechsel der Badflüssigkeit aus dem Präparat entfernt worden war.

**2. Die Wirkung von Dekamethonium.** Zur Untersuchung gelangten Zwerchfelle, die 6, 8, 18 und 24 Std., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 21 und 23 Tage, 4, 5, 7 und 10 Wochen sowie 3, 5 und 6 Monate denerviert waren.

In den ersten zwei Tagen nach der Denervation verursachte C 10 ($1:10^5$) eine etwa 20%ige Abnahme der Zuckungshöhe elektrisch ausgelöster Kontraktionen. (Eine ähnliche Verminderung der Hubhöhe trat auch bei Anwendung der gleichen Konzentration von C 10 an direkt gereizten normalen Zwerchfellen auf.) Vom 3. Tag an konnte außer einer stärkeren Abnahme der Hubhöhe durch C 10 ($1:10^5$) bei einem von zwei

Diaphragmen eine Senkung der „Grundlinie" beobachtet werden (Abb. 3a). Auf große Dosen von C 10 ($1:5 \times 10^3$) erfolgte eine leichte Kontraktur (15% der Zuckungshöhe), die 30 sec dauerte. Am 4. und 5. Tag nach Denervation waren Kontraktur und Senkung der „Grundlinie" bei jedem der vier untersuchten Zwerchfelle deutlich ausgeprägt (Abb. 3b). In den anschließenden Denervationsstadien trat die Senkung der „Grundlinie" nach Gabe von C 10 nicht mehr auf; dagegen nahm die Größe der Kontraktur und das Ausmaß der Hubhöhenverminderung zu (Abb. 3c u. d).

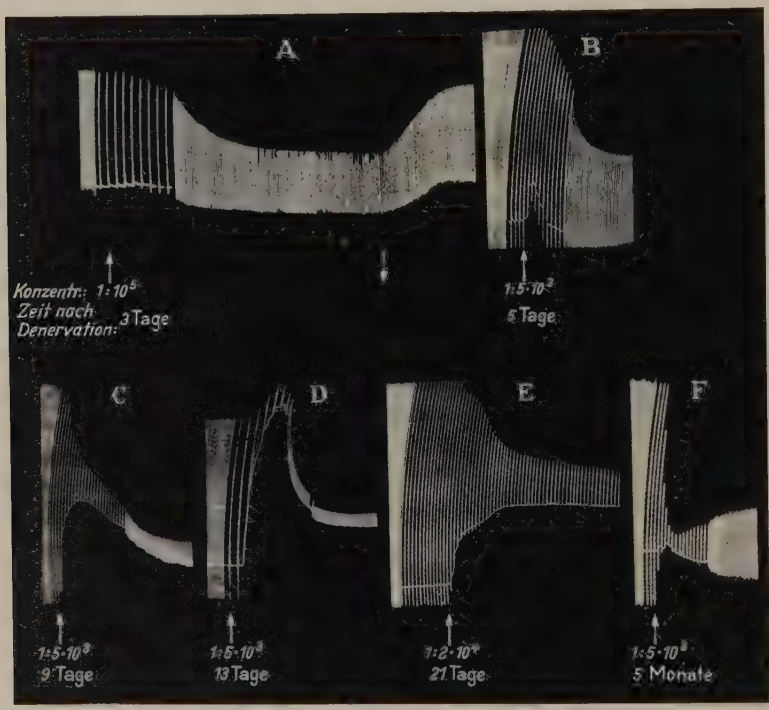



Abb. 3. Wirkung von C 10 auf das denervierte Rattenzwerchfell. Technische Daten s. Abb. 1. Registrierung isotonisch (*a, c, f*) bzw. „halbisometrisch" (*b, d, e*). ↑ = Gabe von C 10. ↓ = Badwechsel.

Ähnlich wie bei der Wirkung von Ach auf 1—4 Wochen denervierte Diaphragmahälften wurde auch nach C 10 ein Kontraktur-Rückstand beobachtet (2.—5. Woche Abb. 3d u. e). An chronisch denervierten Zwerchfellen führte Zusatz von C 10 nur zu einer Verminderung der Hubhöhe (Abb. 3f).

Mehrfacher Badwechsel stellte zwar die ursprünglich vorhandene Kontraktionshöhe des elektrisch gereizten Zwerchfelles wieder her, jedoch war der Einfluß vorheriger Anwendung von C 10 an späteren C 10-Effekten selbst sichtbar: wurde mehrmals hintereinander C 10 gegeben,

so blieb trotz sorgfältigen Ausspülens der Substanz zunächst die Verminderung der Hubhöhe durch C 10 aus. Bei weiteren Gaben erfolgte auch die Kontraktur nicht mehr.

**3. Die Wirkung von d-Tubocurarin.** Der Einfluß hoher Dosen von dTc ($1:10^4$—$1:5\times10^3$) wurde an Zwerchfellen untersucht, die 8, 18, 24 und 48 Std, 3, 5, 6, 8, 9, 13, 21, 22, 23, 27 und 29 Tage, 5, 7 und 10 Wochen sowie 5 und 6 Monate denerviert waren. Während in den ersten 24 Std nach Denervierung dTc keine Wirkung auf die Zuckungshöhe hatte, verursachte es bei zwei nach 48 Std untersuchten Zwerchfellen eine Verminderung der Hubhöhe um 60 bzw. 80%. Vom 3.—21. Tag reagierten die isolierten Diaphragmahälften einheitlich: Nach Gabe von dTc trat eine Senkung der „Grundlinie" verbunden mit einem verstärkten „Durchreißen" des

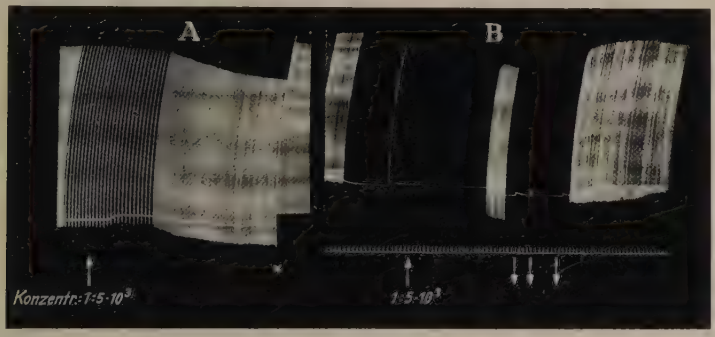



Abb. 4. Wirkung von dTc am denervierten Rattenzwerchfell. a) Technische Daten s. Abb. 1. Registrierung „halbisometrisch" 21 Tage nach Denervation. ↑ = Gabe von dTc; × = 3mal Auswaschen bei stehendem Kymographion, 20 min Stop. b) Technische Daten wie in Abb. 1, jedoch elektrische Reizung zeitweise unterbrochen. Zeitschreibung 30 sec, Registrierung „halbisometrisch"; 9 Tage nach Denervation. ↑ = Gabe von dTc, ↓ = Badwechsel.

Schreibhebels auf. Letzteres ist an dem vergrößerten Abstand der Fußpunkte der Kontraktion von der „Grundlinie" zu erkennen (Abb. 4a). Gelegentlich war die Hubhöhe vermindert, jedoch nie mehr als 20%. Wie Abb. 4b zeigt, ist die Senkung der „Grundlinie" nur dann zu erhalten, wenn der Muskel ständig gereizt wird. Dies gilt auch für das Auswaschen des beschriebenen Effektes.

Bei den am 22. und 23. Tag nach Denervation untersuchten Zwerchfellen war die Senkung der „Grundlinie" nur angedeutet; vom 27. Tag an konnten wir den Effekt nicht mehr beobachten. Dagegen wiesen bei Gabe von dTc alle Diaphragmen vom 27. Tag an eine Verringerung der Hubhöhe auf, die stets mehr als 20% betrug und reproduzierbar war. Eine Kontraktur wurde durch dTc in keinem Denervationsstadium ausgelöst. Die Wirkung des dTc auf die „Grundlinie" zeigte eine ausgeprägte Tachyphylaxie.

## Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Reaktion des denervierten M. gastrocnemius der Katze gegenüber naharterieller Gabe von Ach äußert sich nach Brown a) in einer kurzen Zuckung, die durch eine wesentlich kleinere Dosis als am normalen Muskel auszulösen ist, und b) in einer anschließenden längeren Kontrakturphase, in welcher der Muskel einen elektrischen Reiz weniger gut beantwortet. Dieselben Beobachtungen machten teilweise auch an anderen Muskeln der Katze Rosenblueth u. Luco sowie Reid u. Vaughan Williams. Bei intravenöser oder fernarterieller Verabreichung wird durch Ach nur die Kontraktur hervorgerufen. Diese tritt erstmalig 4—5 Tage nach Denervierung auf. Die maximale Ach-Empfindlichkeit ist etwa am 10. Tag erreicht.

Die von uns am denervierten isolierten Zwerchfellpräparat erhaltene Ach-Kontraktur dürfte mit der oben erwähnten Kontrakturphase des Muskels in situ identisch sein.

Die Analogie ergibt sich aus dem zeitlichen Verlauf der Verkürzung, der gleichzeitig auftretenden Verminderung der Zuckungshöhe bei elektrischem Einzelreiz, der Ausbildung eines Kontraktur-Rückstandes sowie der zur Kontrakturauslösung erforderlichen Konzentration von Ach, die von dem Denervationsstadium abhängig ist.

Unter unseren Versuchsbedingungen konnte die bei naharterieller Injektion von Ach beobachtete Zuckungsreaktion nicht gesehen werden. Durch Zusatz der Substanz zur Badflüssigkeit wird anscheinend ebensowenig wie bei intravenöser Gabe (s. oben) eine die Mehrzahl der Muskelfasern gleichzeitig erreichende hohe Ach-Konzentration erzielt, wie sie zur Auflösung der Zuckung notwendig ist. Dabei besitzt das denervierte Zwerchfell durchaus die Fähigkeit, bei elektrischer Reizung mit einer Einzelzuckung zu reagieren.

Die am isolierten denervierten Rattenzwerchfell erhobenen Befunde sind, abgesehen von kleineren zeitlichen Differenzen des Beginns und des Maximums der Ach-Kontraktur, mit den Resultaten der oben zitierten Autoren in Übereinstimmung zu bringen. Dies ist überraschend, weil die verwendeten Muskeln der Katze nach Denervation atrophieren, das von uns benutzte Zwerchfell zunächst aber hypertrophiert. Wir konnten die eingangs erwähnten Ergebnisse von Sola u. Martin bestätigen, obwohl wir methodisch etwas anders vorgingen (Lüllmann u. Muscholl). Somit läßt sich zumindest am Rattenzwerchfell die Unabhängigkeit der Eigenschaft des denervierten Muskels, auf Ach mit einer Kontraktur zu antworten, von der Atrophie des Muskels zeigen.

Bei unseren Versuchen erzielte C 10 ähnliche Reaktionen wie Ach: Kontraktur, Verminderung der Hubhöhe, Änderung der Empfindlichkeit des Muskels gegenüber einer bestimmten Dosis, Ausbildung des Kontraktur-Rückstandes und späterhin dessen Verlust. Auch das vom Denervationsstadium abhängige Auftreten dieser Erscheinungen erfolgte nach C 10 zu praktisch denselben Zeitpunkten wie nach Ach. Zaimis (1951)

hatte bei naharterieller Gabe von C 10 ebenso wie nach Ach am denervierten Muskel eine Zuckung und anschließend Kontraktur beobachtet, die von einer Abnahme der Spannungsentwicklung (direkter elektrischer Reiz) begleitet war. Ebenso wie in unseren Versuchen waren von C 10 höhere Dosen als von Ach erforderlich. Die von Zaimis beschriebenen Effekte beruhen auf der depolarisierenden Wirkung von C 10, die experimentell auch direkt nachgewiesen wurde (Übersicht bei Paton u. Zaimis; Riker). Die sich aus unseren Untersuchungen ergebenden Ach-ähnlichen Reaktionen nach C 10 lassen sich durchaus auf die Depolarisation der Muskelfaser zurückführen.

C 10 besaß aber auch Wirkungen, die bei Verwendung von Ach nicht zu beobachten waren: a) Die Senkung der „Grundlinie", die nur vom 3. bis 5. Tag nach Phrenicusexhärese auftrat, und b) die abnehmende Wirksamkeit aufeinanderfolgender C 10-Dosen. In der Untersuchung über Alkyl-trimethylammonium-Verbindungen an Hund und Katze publizierten Phillippot u. Dallemagne Kurven (s. Abb. 2, 6, 7 u. 9 daselbst), die eine ähnliche Reaktion des denervierten M. soleus auf C 10 und Strukturverwandte aufzeigen, wie unsere Abb. 3b. Ein Hinweis auf diese Erscheinung (hier als Senkung der „Grundlinie" bezeichnet) wurde von den Autoren nicht gegeben.

Eine allmähliche Verminderung der neuromuskulär blockierenden Wirkung von C 10 teilten Paton u. Zaimis mit: an Affen, Hunden, Hasen, Meerschweinchen und Ratten entwickelte sich bei Gabe von C 10 eine Tachyphylaxie; diese beruht auf einem Umschlag der depolarisierenden in eine kompetitiv hemmende, dTc-artige Eigenschaft des C 10. Weitere Befunde über einen derartigen Wirkungswandel von C 10 sind von Zaimis sowie Hall u. Parkers erhoben worden. Unsere Versuche weisen darauf hin, daß nicht nur die Endplatte, sondern auch der denervierte Muskel die beschriebene Eigenart besitzen kann.

Verschiedene Untersucher erhielten nach intraarterieller Gabe von dTc Kontrakturen von denervierten Muskeln des Hundes (McIntyre, King u. Dunn; Bean u. Elwell; Gluckman). Wir konnten dagegen am isolierten Muskel der Ratte einen gleichartigen Effekt nicht feststellen, obwohl wir in jedem Denervationsstadium Dosen bis $1:5 \times 10^3$ anwandten. Aus den Ergebnissen von Bean u. Elwell ist zu ersehen, daß an dem Zustandekommen der Ach-artigen Wirkung von dTc am denervierten Muskel die gleichzeitig auftretende Steigerung der Durchblutung von Einfluß und die Anwendung elektrischer Einzelreize eine Bedingung ist. Paton u. Zaimis betonen die Ausnahmestellung der Kontraktur des denervierten Muskels nach dTc, da diese Substanz generell einen rein kompetitiven Effekt entfaltet.

In der Literatur fanden wir keinen Hinweis dafür, daß hohe Dosen von dTc eine der Senkung der „Grundlinie" ähnliche Reaktion auslösen. Aus unseren Befunden ergibt sich bisher nur, daß dieser Effekt an das Vorhandensein von Einzelzuckungen gebunden ist; über die Bedeutung unserer speziellen Versuchsbedingungen (isoliertes Präparat, „roter" Muskel, „Durchreißen" des Schreibhebels) auf die Veränderung der „Grundlinie" und die Verminderung der Hubhöhe kann nichts ausgesagt werden.

In Übereinstimmung mit Hall u. Knox sahen wir den Beginn der Fibrillationen des Rattenzwerchfelles 48 Std nach Exhärese des N. phrenicus. Langley, später Tower sowie Levine, Hechter u. Soskin hatten die Denervationsatrophie des Skeletmuskels auf die ständige fibrillatorische Aktivität zurückgeführt, die durch Erschöpfung der Energiereserven den Gewichtsverlust verursachen sollte. Magladery u. Solandt dagegen konnten durch Chinidin zwar die Fibrillationen, nicht aber die Atrophie des Muskels verhindern. Humoller, Hatch, Ware u. McIntyre beobachteten eine Verminderung des Muskelgewichtes nach Immobilisation, gleich ob diese durch Neurotomie oder durch Tenotomie (ohne Fibrillationen einhergehend) hervorgerufen war.

Am denervierten Zwerchfell folgt dem Auftreten der spontanen Aktivität sogar ein Gewichtsanstieg bis zum 8. Tag nach Durchtrennung des Nerven. Somit läßt sich ein weiterer Hinweis dafür geben, daß die Denervationsatrophie nicht ursächlich auf das Fibrillieren des Muskels zurückgeführt werden kann.

Wir glauben, durch die vorliegende Untersuchung an einem isolierten Präparat eine notwendige Ergänzung der Befunde verschiedener Autoren am Muskel in situ gegeben zu haben. Gegenüber den bisher vorliegenden Experimenten am denervierten, isolierten Muskel erfaßten wir bei unserer Darstellung alle, auch die sehr frühen Denervationsstadien und prüften die drei Substanzen Ach, C 10 und dTc unter vergleichbaren Bedingungen.

## Zusammenfassung.

An 41 isolierten Zwerchfellpräparaten der Ratte wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Exhärese des N. phrenicus die Wirkung von Acetylcholin (Ach), Decamethonium (C 10) und d-Tubocurarin (dTc) untersucht. Die Reaktionen des Muskels zeigten eine charakteristische Abhängigkeit von der Denervationsdauer. Ach verursachte eine Verminderung der Hubhöhe elektrisch ausgelöster Einzelzuckungen, Kontraktur und Kontraktur-Rückstand. Die Wirkung von C 10 ähnelte der von Ach weitgehend. Dagegen führte Gabe von dTc zu einer Senkung der „Grundlinie“ und zur Verminderung der Hubhöhe der Einzelzuckungen.

Die Befunde werden in ausführlichem Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren besprochen.

## Literatur.

Bean, J. W., and L. H. Elwell: Influence of dTC on contractile response of mammalian sceletal muscle in situ. Amer. J. Physiol. **165**, 716 (1951). — Brown, G. L.: The actions of acetylcholine on denervated mammalian and frog muscle. J. of Physiol. **89**, 438 (1937). — Dale, H. H., and J. H. Gaddum: Reactions of denervated voluntary muscle, and their bearing on the mode of action of parasympathetic and related nerves. J. of Physiol. **70**, 109 (1930). — Frank, E., M. Nothmann u. H. Hirsch-Kaufmann: Über die „tonische“ Kontraktion des quergestreiften Säugetiermuskels nach Ausschaltung des motorischen Nervens. Pflügers Arch. **197**, 270 (1922). — Gluckman, M. I.: Comparative actions of some neuromuscular

blocking agents on „red" and „white" muscle in the dog. Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 320 (1953). — Hajdu, S., J. A. C. Knox and R. J. S. McDowall: Potassium and neuromuscular transmission. J. of Physiol. **111**, 382 (1950). — Hall, J. E., and J. A. C. Knox: Fibrillation in the isolated rat diaphragm preparation after denervation. J. of Pysiol. **116**, 29 P (1952). — Hall, R. A., and M. W. Parkers: The effect of drugs upon neuromuscular transmission in the guinea-pig. J. of Physiol. **122**, 274 (1953). — Humoller, F. L., D. Hatch, F. Ware and A. R. McIntyre: Effect of immobilization on oxygen uptake of skeletal muscle. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 380 (1953). — Knowlton, G. C., and H. M. Himes: Acetylcholine — contracture of denervated muscle. Amer. J. Physiol. **120**, 757 (1937). — Langley, J. N.: Observations on denervated muscle. J. of Physiol. **50**, 335 (1916). — Levine, R., O. Hechter and S. Soskin: Biochemical characteristics of denervated skeletal muscle, at rest and after direct stimulation. Amer. J. Physiol. **132**, 336 (1941). — Lüllmann, H., u. H. Brunner: Ein isoliertes Nerv-Muskel-Präparat des m. serratus der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 254 (1954). — Lüllmann, H., u. E. Muscholl: a) Über die Wirkung hypotoner Salzlösungen auf das Rattenzwerchfell. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 209 (1954). — b) in Vorbereitung. — Magladery, J. W., and D. Y. Solandt: Relation of fibrillation to acetylcholine and potassium sensitivity in denervated skeletal muscle. J. of Neurophysiol. **5**, 357 (1942). — Martin A. W., and O. M. Sola: Federat. Proc. **7**, 78 (1949). — McDowall: R. J. S., K. A. Montagu and R. S. Watson: The effects of sodium and calcium on the reactions of the rat diaphragm. J. of. Physiol. **114**, 48 P (1951). — McDowall, R. J. S., and R. Watson: The inhibitory action of acetylcholine with special reference to small doses. J. of Physiol. **114**, 515 (1951). — McIntyre, A. R., R. E. King and A. L. Dunn: Electrical activity of denervated mammalian skeletal muscle as influenced by d-tubocurarine. J. of Neurophysiol. **8**, 297 (1945). — Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: The methonium compounds. Pharmacol. Rev. **4**, 219 (1952). — Phillippot, E., and M. J. Dallemagne: Action des sels d'alkyl-triméthylammonium sur les muscles normaux et énervés du chat et du chien. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 100 (1953). — Reid, G., and E. M. Vaughan Williams: The development of sensitivity to acetylcholine in denervated muscle. J. of Physiol. **109**, 25 (1949). — Riker, W. F.: Excitatory and anti-curare properties of acetylcholine and related quaternary ammonium compounds at the neuromuscular junction. Pharmacol. Rev. **5**, 1 (1953). — Rosenblueth, A., and J. V. Luco: A study of denervated mammalian skeletal muscle. Amer. J. Physiol. **120**, 781 (1937). — Sola, O. M., and A. W. Martin: Denervation hypertrophy and atrophy of the hemidiaphragm of the rat. Amer. J. Physiol. **172**, 324 (1953). — Tower, S. S.: The reactions of muscle to denervation. Physiologic. Rev. **19**, 1 (1939). — Zaimis, E. J.: The action of decamethonium on normal and denervated mammalian muscle. J. of Physiol. **112**, 176 (1951). — Motor end-plate differences as a determining factor in the mode of action of neuromuscular blocking substances. J. of Physiol. **122**, 238 (1935).

Dr. med. Erich Muscholl, Mainz, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 98—102 (1955).

Aus der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Frhr. v. Kress).

# Das Blutvolumen einiger Rattenorgane und ihre Restblutmenge nach Entbluten bzw. Durchspülung. Bestimmung mit $P^{32}$-markierten Erythrocyten.

Von

K. Oeff und A. König.

*(Eingegangen am 22. Februar 1955.)*

Die Kenntnis der Blutbeimengung ist bei chemischen und radiochemischen Analysen von Organen oft von Bedeutung. Besonders interessiert häufig die Frage, wie und in welchem Ausmaß das Blut aus den Organen entfernt werden kann. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über Austauschvorgänge zwischen Blut und Gewebe (Oeff) haben wir das Blutvolumen einiger Rattenorgane und die Restblutmenge nach Entbluten bzw. Durchspülung bestimmt.

Von den bekannten Methoden erwies sich die Blutvolumenbestimmung mit $P^{32}$-markierten Erythrocyten am geeignetsten, da $P^{32}$ in die Erythrocyten fest eingebaut wird und die markierten Zellen lange im Gefäßsystem verbleiben (Hahn u. Hevesy, Nylin u. Hedlund).

Dagegen macht sich bei Verwendung von markiertem Serumeiweiß der Austausch zwischen intravasculärem und extravasculärem Eiweiß störend bemerkbar, wobei — besonders bei kleinen Versuchstieren — relativ schnell Serumeiweiß in die parenchymatösen Organe übertritt, wie wir an anderer Stelle ausführlich darstellen werden (Oeff und König). Die üblichen Farbstoffmethoden erwiesen sich einerseits wegen des noch ungenügend aufgeklärten „cat-effect", bei dem wahrscheinlich eine Farbstoffaufnahme durch Zellen des RES eine Rolle spielt (Cruickshank u. Whitfield), und andererseits wegen der schwierigen Extraktion aus Geweben für unsere Zwecke als ungeeignet. Außerdem unterliegen Farbstoffe, die an Albumin gebunden sind (z. B. Evansblau), ähnlichen kinetischen Bedingungen wie $J^{131}$-Albumin.

## Methodik.

Die Erythrocyten wurden in üblicher Weise markiert: 8 cm³ Vetrenblut einer Ratte wurden mit 50 $\mu$C $P^{32}$ 2 Std bei 37° inkubiert. Danach wurde 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert, das Serum abpipettiert, und die Erythrocyten dreimal mit isotonischer NaCl-Lösung nachgewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde mit NaCl-Lösung wieder auf 8 cm³ aufgefüllt.

Die Untersuchungen wurden an 12 Ratten im Gewicht von 150—220 g durchgeführt. Jede Ratte erhielt genau 0,5 cm³ der $P^{32}$-Erythrocytensuspension in eine Schwanzvene injiziert. 3 min p. inj. wurde in Äthernarkose der Thorax eröffnet. Jeweils 4 Tiere wurden wie folgt weiterbehandelt.

Gruppe A: Sofort nach Eröffnen des Thorax wurden die großen Gefäße mit Moskitoklemmen abgeklemmt und die Organe unter Belassung der Klemmen entnommen.

Gruppe B: Nach Eröffnen des Thorax Entbluten durch Herzpunktion.

Gruppe C: Nach Eröffnen des Thorax Entbluten durch Herzpunktion. Durchtrennung der Vena cava caud. oberhalb des Zwerchfells. Injektion einer kleinen Menge NaCl-Lösung in den re. Ventrikel und Durchspülung der Lungen. Punktion des li. Ventrikels und Durchspülung des Gefäßsystems mit 50 cm³ NaCl-Lösung unter einem Druck von etwa 60 cm $H_2O$ (Steigrohr!).

Alle Organe wurden in feuchtem Zustand gewogen. Von jedem Organ wurde bis zu 1 g nach Zusatz von Trägersubstanz (1,5 cm³ einer 14%igen $Na_3PO_4$-Lösung) naß verascht. Das Phosphat wurde als Magnesium-Ammoniumphosphat gefällt und abfiltriert. Zur Filtration benutzten wir V 2 A-Stahlschälchen (2,5 cm ⌀) mit siebartigem Boden, auf den wir Membranfilter geklebt hatten. Diese Schälchen dienten — nach Trocknung im Brutschrank — gleich als Meßschälchen. Die Aktivitätsbestimmung wurde mit Autoscaler und Probenwechsler durchgeführt.

Aliquote Teile der zur Injektion verwandten Erythrocytensuspension wurden wie Organ- und Blutproben verarbeitet und dienten als Standardpräparat. Die Restaktivität in Injektionsspritze und Kanüle wurde bei der Berechnung der injizierten Menge berücksichtigt.

Die Blutvolumina der Organe wurden berechnet aus dem Verhältnis der Aktivität pro Einheit Blut zur gemessenen Organaktivität.

## Ergebnisse.

Das Volumen des zirkulierenden Blutes der Tiere betrug im Mittel 6,72% des Körpergewichtes (Tab. 1). Die Werte stimmen mit den von anderen Autoren mitgeteilten Ergebnissen überein (Tab. 2).

Tabelle 1. *Blutvolumen von 12 Ratten (Mittelwert und Standardabweichung σ).*

| Gruppe | Tier | Geschlecht | Körpergewicht (g) | Blutvolumen (cm³) | Blutvolumen (cm³/100 g Körpergewicht) |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 1 | ♀ | 150 | 10,0 | 6,67 |
| | 2 | ♂ | 170 | 11,5 | 6,77 |
| | 3 | ♀ | 185 | 12,3 | 6,65 |
| | 4 | ♂ | 190 | 14,2 | 7,48 |
| B | 5 | ♂ | 165 | 10,5 | 6,37 |
| | 6 | ♀ | 180 | 10,4 | 5,78 |
| | 7 | ♀ | 195 | 13,2 | 6,77 |
| | 8 | ♂ | 220 | 15,7 | 7,14 |
| C | 9 | ♀ | 180 | 12,4 | 6,89 |
| | 10 | ♂ | 195 | 13,3 | 6,82 |
| | 11 | ♂ | 210 | 14,3 | 6,82 |
| | 12 | ♂ | 220 | 14,2 | 6,46 |
| | | | 188,3 | 12,7 | 6,72 ± 0,414 |

Das Blutvolumen der einzelnen Organe und die Restblutmenge nach Entblutung bzw. Durchspülung in situ sind in Tab. 3 dargestellt. Wie ersichtlich, haben die einzelnen Organe und Gewebe sehr unterschiedlichen

Blutgehalt: Milz, Leber, Niere, kollabierte Lunge und Herz (mit Blut in Kammern und Vorhöfen) enthalten 0,1—0,5 $cm^3$ Blut pro Gramm Organ, während Magen-Darmtrakt, Gehirn, Muskel und Fett unter 0,1 $cm^3/g$ aufweisen.

Tabelle 2. *Übersicht über die mit verschiedenen Methoden ermittelten Blutvolumina bei Ratten.*

| Methode | Blutvolumen ($cm^3$/100 g Körpergewicht) | Autor |
|---|---|---|
| Vitalrot | 6,9 | Cartland u. a. (1928) |
| Vitalrot | 7,4 | Went u. a. (1929) |
| Vitalrot | 6,4 | Orten u. a. (1933) |
| Vitalrot | 4,3 | Griffith u. a. (1937) |
| Evansblau | 8,0 | Beckwith u. a. (1941) |
| Evansblau | 7,6 | Metcalf u. a. (1944) |
| Phosphor-32 | 4,6 | Berlin u. a. (1949) |
| Eisen-59 | 4,7 | Berlin u. a. (1949) |
| Evansblau | 5,0 | Loring u. a. (1954) |
| Kohlenoxyd | 6,5 | Gemzell u. a. (1954) |
| Phosphor-32 | 6,7 | Eigene Untersuchungen |

Für die Berechnung dieser Werte wurde vorausgesetzt, daß in den Organen der gleiche Verdünnungsgrad der markierten Erythrocyten vorliegt wie im Herzblut, d. h. daß der Hämatokritwert des Organblutes mit dem des Herzblutes identisch ist.

Zum Vergleich mit unseren Ergebnissen seien die Plasmavolumina einiger Organe von Mäusen vermerkt, die Wish u. Mitarb. bei Untersuchungen mit $J^{131}$-Plasma ermittelt haben. Danach hat die Milz ein Plasmavolumen von 0,11 $cm^3/g$ Organ, die Lunge 0,23, die Niere 0,16 und die Leber 0,20 $cm^3/g$.

Nach einfachem Entbluten mittels Herzpunktion ist der Blutgehalt der Organe deutlich vermindert.

Eine weitere Verringerung wird durch die Durchspülung der in situ befindlichen Organe mit isotonischer NaCl-Lösung erreicht: Der Blutgehalt beträgt dann nur noch ein Drittel (z. B. Milz) bis ein Zehntel (Herz) der Normalwerte. Die restlose Entfernung von Erythrocyten gelang jedoch bei keinem Organ.

## Zusammenfassung.

Mit Hilfe von $P^{32}$-markierten Erythrocyten wurde das Gesamtblutvolumen bei der Ratte und das Blutvolumen der einzelnen Organe bestimmt. Der Blutgehalt der Organe betrug bis zu 0,5 $cm^3/g$ Organ. Außerdem wurde die Verminderung des Blutgehaltes nach Entbluten

bzw. Durchspülen der in situ befindlichen Organe mit isotonischer NaCl-Lösung untersucht. Nach Durchspülen war zwar der Blutgehalt erheblich vermindert; eine geringe Restblutmenge war jedoch in allen Organen nachzuweisen.

Tabelle 3. *Gewicht und Blutgehalt von Rattenorganen (Mittelwerte und durchschnittliche Abweichung von je 4 Organen und von 2 männlichen Genitalorganen in Gruppe A und B, sowie 3 in Gruppe C).*

| Organ | Gewicht in g | | | Blutgehalt in cm³/g Organ | | | Blutgehalt in cm³/Gesamtorgan | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| Lunge (kollab.) | 1,31 ± 0,38 | 1,25 ± 0,27 | 1,38 ± 0,18 | 0,43 ± 0,17 | 0,28 ± 0,10 | 0,06 ± 0,01 | 0,66 ± 0,48 | 0,32 ± 0,05 | 0,09 ± 0,02 |
| Niere | 1,22 ± 0,10 | 1,22 ± 0,14 | 1,44 ± 0,40 | 0,37 ± 0,10 | 0,22 ± 0,04 | 0,13 ± 0,04 | 0,45 ± 0,11 | 0,27 ± 0,07 | 0,17 ± 0,04 |
| Gehirn | 1,72 ± 0,01 | 1,55 ± 0,03 | 1,64 ± 0,15 | 0,024 ± 0,001 | 0,018 ± 0,001 | 0,004 ± 0,002 | 0,041 ± 0,001 | 0,029 ± 0,001 | 0,006 ± 0,002 |
| Leber | 6,26 ± 1,23 | 6,20 ± 0,93 | 7,24 ± 1,66 | 0,25 ± 0,07 | 0,14 ± 0,03 | 0,05 ± 0,01 | 1,66 ± 0,84 | 0,87 ± 0,14 | 0,37 ± 0,03 |
| Magen | 1,12 ± 0,18 | 1,03 ± 0,06 | 1,24 ± 0,27 | 0,06 ± 0,01 | 0,02 ± 0,000 | 0,01 ± 0,005 | 0,062 ± 0,001 | 0,02 ± 0,001 | 0,009 ± 0,004 |
| Darm | 6,83 ± 0,84 | 6,65 ± 0,32 | 7,13 ± 0,78 | 0,065 ± 0,025 | 0,02 ± 0,006 | 0,01 ± 0,005 | 0,43 ± 0,09 | 0,15 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 |
| Muskel | — | — | — | 0,03 ± 0,004 | 0,016 ± 0,002 | 0,007 ± 0,004 | — | — | — |
| Fett | — | — | — | 0,027 ± 0,006 | 0,012 ± 0,002 | 0,004 ± 0,000 | — | — | — |
| Milz | 0,63 ± 0,03 | 0,81 ± 0,17 | 0,78 ± 0,25 | 0,19 ± 0,07 | 0,16 ± 0,04 | 0,06 ± 0,02 | 0,14 ± 0,06 | 0,12 ± 0,03 | 0,05 ± 0,01 |
| Herz[1] | 0,97 ± 0,19 | 0,69 ± 0,09 | 0,78 ± 0,16 | 0,51 ± 0,17 | 0,15 ± 0,02 | 0,05 ± 0,03 | 0,49 ± 0,17 | 0,10 ± 0,01 | 0,05 ± 0,03 |
| Nebenniere | 0,04 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,13 ± 0,05 | 0,11 ± 0,04 | 0,05 ± 0,04 | 0,006 ± 0,003 | 0,006 ± 0,002 | 0,002 ± 0,002 |
| Speicheldrüse | 0,59 ± 0,02 | 0,62 ± 0,12 | 0,74 ± 0,03 | 0,10 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 | 0,056 ± 0,008 | 0,024 ± 0,001 | 0,014 ± 0,007 |
| Schilddrüse | — | — | — | — | — | — | 0,027 ± 0,002 | 0,008 ± 0,001 | 0,003 ± 0,002 |
| Genitalorgane ♂ | 2,92 ± 0,30 | 2,34 ± 0,27 | 1,47 ± 0,11 | 0,024 ± 0,003 | 0,016 ± 0,003 | 0,003 ± 0,001 | 0,071 ± 0,017 | 0,037 ± 0,007 | 0,005 ± 0,002 |
| Blase | 0,10 ± 0,01 | 0,08 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 0,06 ± 0,03 | 0,04 ± 0,03 | 0,011 ± 0,001 | 0,004 ± 0,001 | 0,003 ± 0,002 |

[1] Mit Blutinhalt bei Gruppe A.

Gruppe A: nicht entblutet; Gruppe B: entblutet; Gruppe C: entblutet und durchspült.

## Literatur.

Beckwith, J. R., and A. Chanutin: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **46**, 66 (1941). — Berlin, N. I., R. L. Huff, D. C. van Dyke and T. G. Hennessy: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 176 (1949). — Cartland, G. F., and F. C. Koch: Amer. J. Physiol. **85**, 540 (1928). — Cruickshank, E. W. H., and I. C. Whitfield: J. of Physiol. **104**, 52 (1945). — Gemzell, C. A., u. T. Sjöstrand: Acta physiol. scand. (Stockh.) **30**, 369 (1954). — Griffith, J. R., and P. Campbell: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **36**, 38 (1937). — Hahn, L., u. G. Hevesy: Acta physiol. scand. (Stockh.) **3**, 193 (1942). — Loring, W. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **85**, 350, (1954). — Metcalf, J., and C. B. Favour: Amer. J. Physiol. **141**, 697 (1944). — Nylin, G., and S. Hedlund: Amer. Heart J. **33**, 770 (1947). — Oeff, K.: Z. exper. Med. **123**, 294, 309, 434 (1954). — Klin. Wschr. **1954**, 747. — Oeff, K., u. A. König: In Vorbereitung. — Orten, J. M., F. A. Underhill, E. R. Mugrage and R. P. Lewis: J. of Biol. Chem. **99**, 457 (1933). — Went, S., and C. K. Drucker: Amer. J. Physiol. **88**, 468 (1929). — Wish, L., J. Furth and H. Storey: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 644 (1950).

Dr. K. Oeff, Berlin-Charlottenburg 9, Medizinische Klinik der Freien Universität, Spandauer Damm 130.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 103–113 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

# Untersuchungen über die muskellähmende Wirkung des Strophanthins*.

Von

K. Greeff und E. Westermann.

Mit 7 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 2. Februar 1955.)*

Zahlreiche Befunde sprechen dafür, daß Strophanthin eine *Leistungssteigerung* auch des *quergestreiften* Muskels verursacht (Neuschlosz, Weese, Hotovy u. Erdniss, Hotovy u. König u. a.). Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen sollen zeigen, daß auch die mehrfach beschriebene *lähmende* Wirkung hoher Strophanthindosen nicht nur — wie meistens angenommen — zentral-nervös (Lendle, Lendle u. Oldenburg, Masslow, Santesson u. Strindberg u. a.), sondern wenigstens zum Teil peripher, d. h. durch eine Hemmung der neuromuskulären Erregbarkeit oder auch der direkten Erregbarkeit des quergestreiften Muskels bedingt ist. Wir haben unsere Versuche an Ratten durchgeführt, da diese Tierart wegen der geringen Empfindlichkeit ihres Herzens gegen Digitalisglykoside für die Untersuchung extrakardialer Wirkungen besonders geeignet ist, andererseits in den letzten Jahren mehrfach Versuche unter Belastung durch Schwimm- oder Lauftraining mit hohen Strophanthindosen an Ratten durchgeführt wurden, ohne daß hierbei die lähmende Wirkung berücksichtigt wurde.

## Methodik.

Die Versuche wurden an 150—200 g schweren männlichen weißen Ratten gleichen Stammes durchgeführt. Wir benutzten k-Strophanthin der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, und g-Strophanthin der Fa. Kalichemie A-G. Hannover.

Die *Reizversuche am M. gastrocnemius in situ* erfolgten an Ratten in Urethannarkose (0,7 $cm^3$ einer 25%igen Lösung pro 100 g Körpergewicht subcutan). Die Achillessehne wurde durchtrennt und über einen Faden mit einem Schreibhebel verbunden. Der Muskel konnte sowohl indirekt über den freipräparierten N. ischiadicus als auch direkt mit Hilfe einer in den M. gastrocnemius eingestochenen Platinelektrode elektrisch gereizt werden. Die Stromstöße lieferte ein Rechteckimpulsgenerator. Die Reizfrequenz betrug 0,3—1,0 Hz bei einer Impulsdauer von 1—2 msec und supramaximaler Reizintensität. Der Blutdruck wurde in der

* Herrn Prof. Dr. Paul Wels in Verehrung zum 65. Geburtstag.

A. carotis mit einem Hg-Manometer gemessen; die Injektionen erfolgten in die freigelegte V. femoralis. In einem Teil der Versuche wurden die Tiere künstlich beatmet.

Die *Versuche am Phrenicus-Zwerchfellpräparat* der Ratte wurden in der Anordnung nach E. Bülbring in einem Tyrodebad von 40 cm³ bei reichlicher $O_2$-Durchperlung durchgeführt. Das Zwerchfell konnte sowohl direkt als auch indirekt mit Rechteckstromstößen gereizt werden. Der N. phrenicus lag in einer Schnabelelektrode 2 Platindrähten an, während der Muskel von 2 Platinstiften, die beiderseits der Muskelplatte parallel zueinander gelagert waren, quer durchströmt wurde. Bei einer Reizfrequenz von 0,3 Hz betrug die Impulsdauer bei indirekter Reizung 1 msec, bei direkter Reizung 2—10 msec. Die Impulsintensität war supramaximal.

*Kalium- und Natriumbestimmungen in Serum und Muskulatur* erfolgten mit Hilfe des Flammenphotometers der Fa. Zeiss-Jena. Die Zerstäuberdüse hatte einen Durchmesser von etwa 0,1 mm, um die Bestimmung in kleinen Serummengen zu ermöglichen. Die Muskulatur wurde unter Zusatz von Ammoniumnitrat in Platintiegeln verascht.

## Versuche[1].

In Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur traten auch in unseren Versuchen nach der Injektion hoher Strophanthindosen ausgesprochene Lähmungserscheinungen auf. 10—15 min nach der subcutanen Injektion wurde der Gang der Tiere ataktisch, sie konnten sich nur mühsam vorwärtsbewegen; nach 20—30 min kam es zu ausgeprägten Paresen, besonders an den hinteren Extremitäten und an der Nackenmuskulatur. Dabei blieben Schmerz- und Abwehrreaktionen erhalten. Im Laufe 1 Std klangen die Lähmungserscheinungen ab.

Zwischen g- und k-Strophanthin bestand ein deutlicher Wirksamkeitsunterschied: nach 100 $\gamma$/100 g k-Strophanthin traten bei mehr als 50% der Tiere Lähmungen auf, die gleiche g-Strophanthindosis blieb ohne sichtbare Wirkung. Zur Lähmung aller Tiere wurden von k-Strophanthin 150 $\gamma$/100 g, von g-Strophanthin die doppelte Dosis benötigt. Auch die gleichzeitig mit den Lähmungserscheinungen auftretende Senkung der Körpertemperatur war nach k-Strophanthin deutlich stärker als nach g-Strophanthin (Tab. 1 und Abb. 1).

Tabelle 1. *Die lähmende Wirkung hoher g- und k-Strophanthindosen an Ratten.*

| Dosis pro 100 g Körpergewicht s.c. | Anzahl der Tiere | gelähmt | ataktisch | normal |
|---|---|---|---|---|
| g-Strophanthin | | | | |
| 100 $\gamma$ | 20 | 0 | 0 | 20 |
| 150 $\gamma$ | 15 | 4 | 5 | 6 |
| 300 $\gamma$ | 15 | 15 | — | — |
| k-Strophanthin | | | | |
| 100 $\gamma$ | 20 | 12 | 8 | — |
| 150 $\gamma$ | 24 | 24 | — | — |

[1] Ein Teil der Versuche wurde unter Mitarbeit der Doktoranden Fräulein M. Kahl und Herrn H. Bode durchgeführt.

*1. Reizversuche am M. gastrocnemius in situ.*

An insgesamt 19 narkotisierten Ratten wurde das Mechanogramm des elektrisch gereizten M. gastrocnemius registriert. Intravenöse Injektion von 100 $\gamma$/100 g g-Strophanthin führte bei indirekter Reizung zu einer Verbesserung der Muskelleistung, während 300 $\gamma$/100 g eine allmählich einsetzende reversible Lähmung verursachten (Abb. 2). Diese ließ sich im Gegensatz zu den am nichtnarkotisierten Tier regelmäßig auftretenden Lähmungserscheinungen nicht in allen Versuchen reproduzieren, selbst dann nicht, wenn bis zu 1 mg/100 g Strophanthin dosiert wurde. Die auftretenden starken Blutdrucksteigerungen sollen nach Angaben der Literatur vornehmlich durch eine direkte Vasoconstriction, besonders im Gebiet der Splanchnicusgefäße, verursacht sein (Übersicht bei Lendle und Weese).

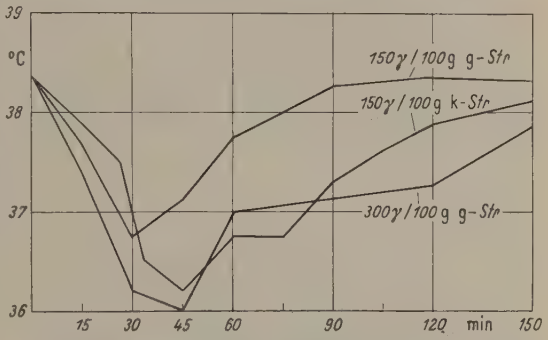



Abb. 1. Die temperatursenkende Wirkung von g- und k-Strophanthin an Ratten. Mittelwerte aus Gruppen von 15—20 Tieren. Subcutane Injektion von Strophanthin. Messung der Rectaltemperatur mit einem Hg-Thermometer.

Über die Frage, ob es sich bei den nach Strophanthin auftretenden Lähmungen um eine Blockierung der neuromuskulären Erregungsübertragung oder um eine direkte muskuläre Hemmungswirkung handelt, gibt der Versuch der Abb. 3 Aufschluß. Hier kam es nach 400 $\gamma$/100 g g-Strophanthin zu einer besonders langdauernden Abschwächung und schließlich vollständigen Blockierung der indirekten Erregbarkeit, während die direkte Erregbarkeit unbeeinflußt blieb.

Daß Strophanthin die neuromuskuläre Erregungsübertragung hemmt, läßt sich besonders deutlich zeigen, wenn man es zusammen mit Succinylcholin injiziert. Die Succinylcholinwirkung wird dann durch an sich unwirksame Strophanthindosen verstärkt. In dem Versuch der Abb. 4 hemmten 4 $\gamma$/100 g Succinylcholin die durch Reizung des N. ischiadicus ausgelösten Muskelkontraktionen um mehr als 50%. Bei gleichzeitiger Gabe von 30 $\gamma$/100 g g-Strophanthin — einer Dosis, die an sich nie lähmend wirkt — kam es zu einem vollständigen neuromuskulären Block, von dem in diesem Versuch auch die Atemmuskulatur betroffen wurde. Der Atemstillstand führte zu einem Anstieg des Blutdrucks mit anschließender starker Blutdrucksenkung. Durch künstliche Beatmung ließ sich der Blutdruck bald wieder normalisieren, während die in-

direkte Erregbarkeit des Muskels erst nach ungefähr 10 min allmählich wieder zurückkehrte.

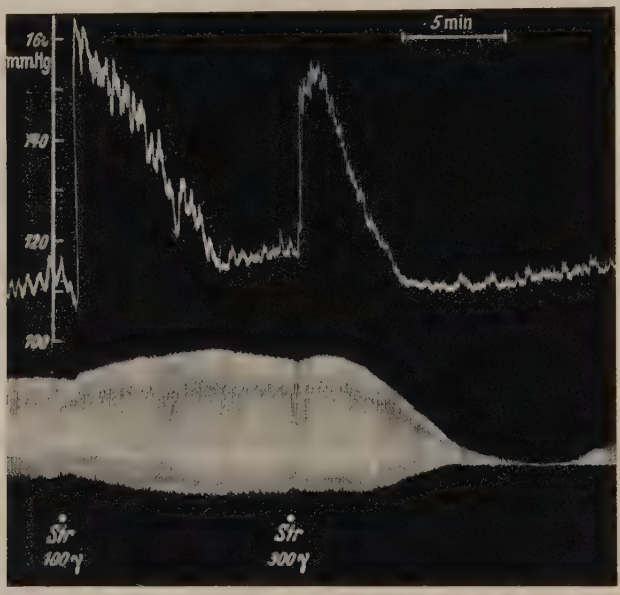



Abb. 2. Die Wirkung hoher Strophanthindosen am elektrisch gereizten M. gastrocnemius der Ratte. Ratte, 300 g, in Urethannarkose. Oben: Blutdruck in der A. carotis. Unten: Mechanogramm des M. gastrocnemius bei Reizung des N. ischiadicus (0,15 Hz, 1 msec, 5 mA). *Str* g-Strophanthin i. v. Dosierung pro 100 g Körpergewicht.

Wenn auch die bisherigen Versuche dafür sprechen, daß an der lähmenden Wirkung des Strophanthins eine Hemmung der neuro-

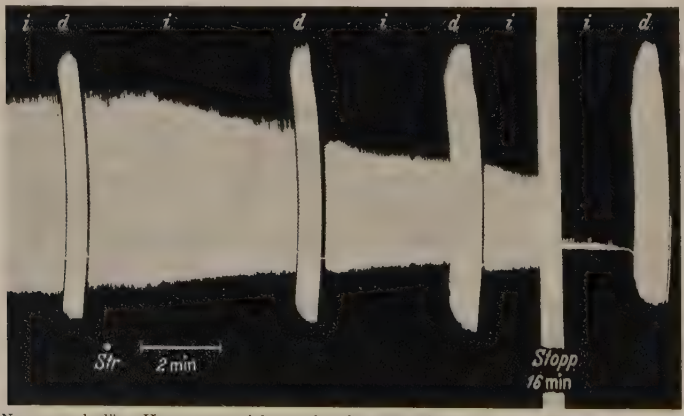



Abb. 3. Neuromuskuläre Hemmungswirkung des Strophanthins. Ratte, 200 g, in Urethannarkose. *d* direkte Reizung des M. gastrocnemius (0,3 Hz, 1,5 mA 2 msec). *i* indirekte Reizung über den N. ischiadicus (0,3 Hz, 1 msec, 1,2 mA); *Str* 400 γ g-Strophanthin/100 g i.v.

muskulären Erregungsübertragung wesentlich beteiligt ist, so scheint nach sehr hohen Dosen oder nach wiederholter Applikation auch der Muskel selbst betroffen zu sein. Wir konnten beobachten, daß dann nach Blockierung der *indirekten* auch die *direkte* Erregbarkeit des Muskels abgeschwächt oder aufgehoben war.

Die am Ganztier erhobenen Befunde wurden am isolierten Phrenicus-Zwerchfellpräparat der Ratte bestätigt.

*2. Versuche am Phrenicus-Zwerchfellpräparat.*

Bisher war es unseres Wissens nicht möglich, am Phrenicus-Zwerchfellpräparat eine Beeinflussung der Erregbarkeit durch Strophanthin nachzuweisen (Hotovy u. Erdniss; Westermann). Allerdings fand Westermann, daß die Hemmungswirkung des Succinylcholins durch Strophanthin verstärkt wird.

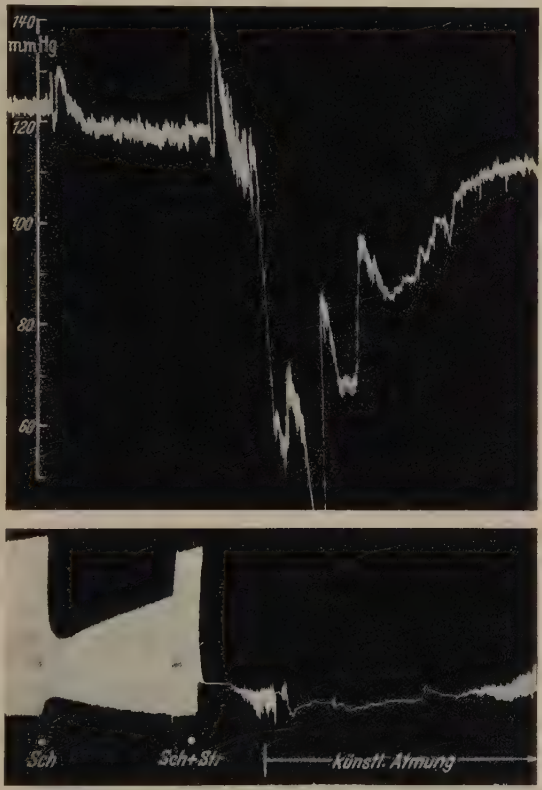



Abb. 4. Verstärkung der Succinylcholinwirkung durch Strophanthin. Ratte, 250 g. Oben: Blutdruck in der A. carotis. Unten: Mechanogramm des M. gastrocnemius bei indirekter Reizung (1 Hz, 1 msec, 2 mA). *Sch* 4 $\gamma$/100 g Succinylcholin i.v. *Str* 30 $\gamma$/100 g Strophanthin i.v.

Es ist bekannt, daß es sowohl nach Succinylcholin (Klupp, Kobinger u. Kraupp) als nach Strophanthin zu einer Kaliämie kommt, was auch unsere eigenen Versuche zeigten. Wir haben deshalb untersucht, ob es durch Erhöhung des Kaliumgehaltes der Tyrodelösung gelingt, auch am isolierten Zwerchfellpräparat die in vivo beobachtete Lähmungswirkung des Strophanthins zu erhalten. — Die von uns benutzte Normaltyrodelösung nach E. Bülbring enthält 10,4 mg-% Kalium. Der Serumkaliumgehalt der Ratte liegt bei 17 mg-% (Hotovy u. König). Verdoppelung des Kaliumgehaltes der Tyrodelösung genügte nicht, Eigenwirkungen des Strophanthins auftreten zu lassen. Erst bei einer Verdreifachung der Kaliumionenkonzentration (30 mg-%) ließ sich

die lähmende Wirkung des Strophanthins auch in vitro zeigen: nach einer geringfügigen und nur kurzdauernden Verbesserung der Muskelkontraktionen kam es zu einer deutlichen Abnahme sowohl der direkten als auch der indirekten Erregbarkeit (Abb. 5). Durch die Hemmung auch

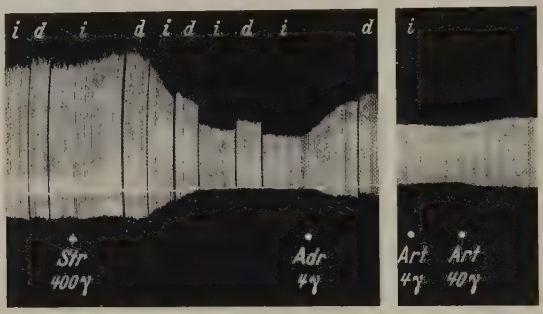



Abb. 5. Hemmungswirkung des Strophanthins am isolierten Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte. Kaliumgehalt der Tyrodelösung auf 30 mg-% erhöht. Badvolumen 40 cm³. — *d* direkte Reizung (0,15 Hz, 5 msec, 40 mA); *i* indirekte Reizung (0,15 Hz, 1 msec, 7 mA); *Str* g-Strophanthin; *Adr* l-Adrenalin; *Art* l-Arterenol.

der direkten Erregbarkeit unterscheidet sich Strophanthin von Succinylcholin. In dem Versuch der Abb. 6 verursachten unter 30 mg-% Kalium das „Muskelrelaxans" Succinylcholin und g-Strophanthin in der gleichen Dosierung (600 $\gamma$) eine vollständige Aufhebung der indirekten Erregbarkeit, während die direkte Erregbarkeit des Muskels durch Succinylcholin kaum beeinflußt, durch Strophanthin jedoch fast vollständig ausgelöscht wurde. Die Hemmung der direkten Erregbarkeit läßt sich auch mit Kalium allein erzielen, wenn man seine Konzentration z. B. auf 50 mg-% erhöht.

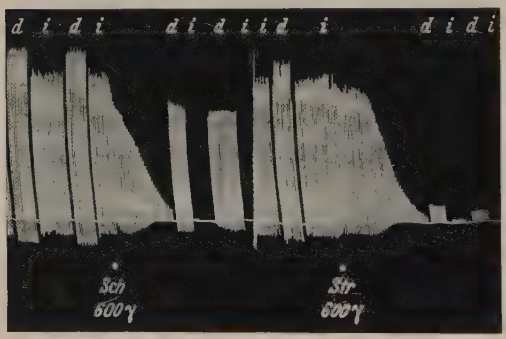



Abb. 6. Vergleich der Wirkung von Succinylcholin und Strophanthin am isolierten Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte. Versuchsbedingungen wie Abb. 5. *Sch* Succinylcholin; *Str* k-Strophanthin.

Beide Hemmungswirkungen — die des Strophanthins und des Kaliums — stimmen auch darin überein, daß sie sich durch *Adrenalin* und $CaCl_2$ antagonistisch beeinflussen lassen. *Nor-adrenalin* ist selbst in 10fach höherer Dosierung schwächer wirksam (siehe Abb. 5).

### *3. Veränderungen des Kalium- und Natriumgehaltes in Serum und Muskulatur.*

In Versuchen mit Erythrocyten, deren Kaliumgehalt durch längere Kälteeinwirkung vermindert und deren Natriumgehalt erhöht war, fand SCHATZMANN, daß die bei Körpertemperatur und Glucosegegenwart in Funktion tretende „Na-K-Pumpe", d. h. die Wiederaufnahme von $K^{\cdot}$ und die Abgabe von $Na^{\cdot}$, durch Strophanthin gehemmt wird.

Wir haben die beiden Zwerchfellhälften von Ratten in je 2 $cm^3$ Tyrode bei 38° C und reichlicher $O_2$-Durchperlung mit und ohne Zusatz von Strophanthin inkubiert. Vor der Inkubation wurden die Zwerchfelle 15 min lang in Tyrode gespült. Nach 1stündiger Inkubation fand sich in den strophanthinhaltigen Ansätzen eine starke Zunahme des Kaliumgehaltes der Tyrodelösung. Der Kaliumgehalt der Zwerchfellmuskulatur hatte entsprechend abgenommen (Tab. 2).

Tabelle 2.

*Kaliumverlust des isolierten Zwerchfellmuskels bei Inkubation mit g-Strophanthin.* Der Kaliumverlust wurde aus der in der Tyrodelösung flammenphotometrisch ermittelten Kaliumzunahme berechnet; der Kaliumgehalt des Muskels flammenphotometrisch nach Veraschung (siehe Text).

| $K^{\cdot}$-Verlust des Zwerchfellmuskels in mg-% während 1stündiger Inkubation | | $K^{\cdot}$-Gehalt des Zwerchfellmuskels in mg-% nach 1stündiger Inkubation | | Strophanthin-konzentrationen |
|---|---|---|---|---|
| ohne Strophanthin | mit Strophanthin | ohne Strophanthin | mit Strophanthin | |
| 34 | 47 | — | — | $10^{-5}$ |
| 52 | 81 | 69 | 48 | $10^{-5}$ |
| 62 | 113 | — | — | $5 \times 10^{-5}$ |
| 52 | 114 | 92 | 22 | $10^{-4}$ |
| 70 | 128 | 77 | 32 | $10^{-4}$ |
| 32 | 116 | — | — | $10^{-4}$ |

In weiteren Versuchen haben wir an Gruppen von je 6 Ratten im Gewicht von 110—140 g die Wirkung des Strophanthins auf den Kalium- und Natriumgehalt des Serums, des M. gastrocnemius, des Zwerchfells und des Herzens untersucht. Die Bestimmungen wurden 30 und 180 min nach subcutaner Injektion von 150 $\gamma$/100 g Strophanthin vorgenommen (Tab. 3).

Die unbetäubten Tiere wurden durch Dekapitation getötet und das ausfließende Blut zur Serumgewinnung benutzt. Hiermit hängt es wohl zusammen, daß die von uns ermittelten Normalwerte des Serum-Kaliums höher — im Durchschnitt bei 27 mg-% — liegen, als in den Versuchen anderer Autoren (HOTOVY u. KÖNIG, SCHWARTZ, COHEN u. WALLACE), die am narkotisierten Tier das Blut aus der Aorta entnahmen. In Kontrollversuchen an evipannarkotisierten Ratten fanden auch wir in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur Werte zwischen 16—18 mg-% Kalium.

Tabelle 3. *Einfluß von k-Strophanthin auf den Kalium- und Natriumgehalt des Serums, des M. gastrocnemius, des Zwerchfells und des Herzens.* Weiße Ratten, 110—140 g. Gruppen von je 6 Tieren. *k*-Strophanthin 150 $\gamma$/100 g s.c. (Die P-Werte geben die Signifikanz gegenüber den Kontrollen an.)

| | | Kalium | | | | Natrium | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | mg-% | Differenz geg. Kontr. mg-% | *t* | P | mg-% | Differenz geg. Kontr. mg-% | *t* | P |
| Serum | Kontrolltiere | 27,1 (± 0,62) | | — | — | 384,6 (± 15,4) | | — | — |
| | Stroph. 30 min | 40,2 (± 1,01) | +13,2 | 11,4 | <0,001 | 329,2 (± 15,7) | —55,4 | 2,52 | 0,02—0,05 |
| | Stroph. 180 min | 28,6 (± 1,5) | + 1,5 | 0,924 | 0,3 —0,4 | 384 (± 13,1) | — 0,6 | — | — |
| M. gastro. | Kontrolltiere | 326,3 (± 5,8) | | — | — | 61,9 (± 1,71) | | — | — |
| | Stroph. 30 min | 300,0 (± 4,3) | —26,3 | 3,66 | 0,001—0,01 | 76,7 (± 1,54) | +14,8 | 6,44 | <0,001 |
| | Stroph. 180 min | 295,8 (± 9,6) | —30,5 | 2,72 | 0,02 —0,05 | 80,0 (± 1,44) | +18,1 | 8,75 | <0,001 |
| Zwerchfell | Kontrolltiere | 112,6 (± 6,76) | | — | — | 95,2 (± 8,7) | | — | — |
| | Stroph. 30 min | 91,3 (± 7,3) | − 21,3 | 2,13 | 0,05 —0,1 | 96,5 (± 7,1) | + 1,3 | 0,106 | >0,9 |
| | Stroph. 180 min | 98,8 (± 3,5) | —13,8 | 1,72 | 0,1 —0,2 | 113,1 (± 5,04) | +17,9 | 1,67 | 0,05—0,1 |
| Herz | Kontrolltiere | 147,1 (± 19,3) | | — | — | 80,6 (± 6,53) | | — | — |
| | Stroph. 30 min | 85,5 (± 10,6) | —61,6 | 2,8 | 0,01 —0,02 | 60,9 (± 4,45) | —19,7 | 2,49 | 0,02—0,05 |
| | Stroph. 180 min | 173,8 (± 7,15) | +26,7 | 1,3 | 0,2 —0,3 | 87,3 (± 2,48) | + 6,7 | 0,96 | 0,3 —0,4 |

30 min nach Strophanthin kam es zu einer *Zunahme* des Serum-Kaliums um 13,2 mg-% und zu einer *Abnahme* des Kaliumgehaltes der Muskulatur (Tab. 3). Diese ist im Herzmuskel mit 61,6 mg-% besonders stark. Nach 180 min ist die Kaliämie abgeklungen, auch im Herzmuskel und im Zwerchfell sind die Kaliumwerte gegenüber den Kontrollen nicht mehr signifikant verändert, während der Skeletmuskel (M. gastrocnemius) noch deutlich an Kalium verarmt ist.

Die *Natrium*werte verhalten sich spiegelbildlich — bis auf das Herz. Dieses verarmt unter der Strophanthinwirkung sowohl an Kalium als an Natrium.

Die in der Abb. 7 dargestellten Kurven zeigen, daß k-Strophanthin mit seiner stärkeren muskellähmenden und temperatursenkenden Wirkung auch eine stärkere Kaliämie verursacht als g-Strophanthin: 150 $\gamma$ k-Strophanthin sind fast so wirksam wie 300 $\gamma$ g-Strophanthin. Für die Annahme, daß die nach Strophanthin auftretende Kaliämie in ursächlichem Zusammenhang mit seiner lähmenden Wirkung steht, könnte ferner sprechen, daß das Maximum der Kaliämie zeitlich mit der stärksten Lähmung — und Temperatursenkung — zusammenfällt (siehe Text und Abb. 1).

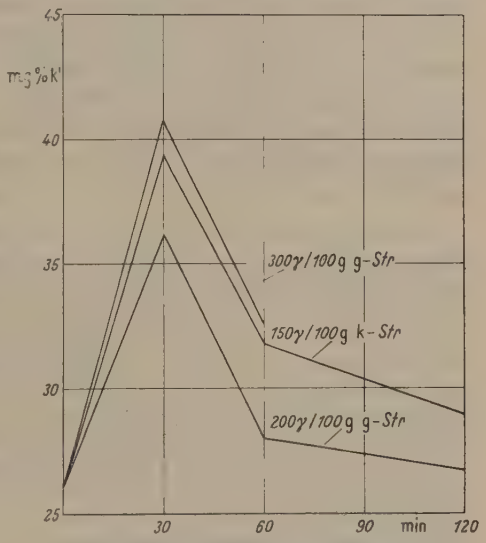



Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Kaliämie nach g- und k-Strophanthin. Mittelwerte aus Gruppen von je 4—8 weißen Ratten. Die einzelnen Gruppen wurden nach 30, 60 bzw. 120 min getötet.

## Besprechung.

Die Muskeltätigkeit ist mit einem ständigen Austausch extra- und intracellulärer Kationen verbunden: bei der *Erregung* dringen Natrium-Ionen in die Muskelzelle ein und es werden Kalium-Ionen nach außen abgegeben. Diese Kationenbewegung verläuft über ein hohes Diffusionsgefälle und liefert Energie. Während der *Erholungsphase* werden umgekehrt Kalium-Ionen wieder in die Zelle hineintransportiert und Natrium-Ionen treten aus. Diese Restitution erfordert jedoch Energie; denn der Ionentransport muß gegen das Gefälle erfolgen.

In Versuchen am isolierten Rattenzwerchfell konnten Taugner, Taugner, Lohmüller und Fleckenstein zeigen, daß eine Erhöhung der extracellulären Kalium-Ionenkonzentration von 10,5 mg-% auf 35—40 mg-% den Muskel schnell unerregbar macht. Der gleiche Effekt ließ sich dadurch erzielen, daß der Natriumgehalt der Tyrodelösung von 352 mg-% normal auf 50 mg-% erniedrigt wurde. In beiden Fällen — sowohl bei der extracellulären Erhöhung des Kalium- als bei der

Erniedrigung des Natriumgehaltes — kommt es zu einem Absinken des für die Muskelkontraktion notwendigen Konzentrationsgefälles.

Unsere Versuche haben gezeigt, daß die an Ratten nach Strophanthin auftretenden Lähmungserscheinungen ebenfalls mit Veränderungen des intra- und extracellulären Kalium- und Natriumgehaltes einhergehen: Der K-Spiegel im Blut steigt an, während die K-Werte in der Skeletmuskulatur absinken. Spiegelbildlich hierzu fällt der Natriumgehalt des Serums ab, während er im Skeletmuskel ansteigt. Es liegt deshalb nahe, die Lähmungswirkung der hohen Strophanthindosen in ursächlichen Zusammenhang zu bringen mit der Beeinflussung des intra- und extracellulären Ionenmilieus, deren Wesen in einer Verkleinerung des Kalium- und Natriumgradienten besteht.

Fleckenstein u. Mitarb. erblicken die Ursache der Muskeladynamie adrenalektomierter Tiere in der Kaliämie, die zu einer Abnahme des Konzentrationsgefälles führt. Die auch durch Strophanthin verursachte Verkleinerung des Konzentrationsgefälles hat aber ihre Ursache nicht nur in einer Erhöhung des *extracellulären*, sondern auch in einer Abnahme des *intracellulären* Kaliums. Um am Zwerchfellpräparat durch Strophanthin eine Hemmungswirkung zu erzielen, ist es zwar erforderlich, den K-Gehalt der Tyrodelösung von 10 mg-% normal auf beispielsweise 30 mg-% zu erhöhen. Wenn aber eine lähmende Strophanthindosis jetzt zu einer weiteren Erniedrigung des K-Gradienten führt, so kann diese nur durch eine Abnahme des intracellulären Kaliums zustande kommen, da der gesamte K-Gehalt des Zwerchfells nicht ausreichen würde, um den K-Gehalt des Tyrodebades (40 $cm^3$) nennenswert zu erhöhen.

Die Ursache dieser Kaliumverarmung des Muskels könnte vielleicht in Analogie zu den schon erwähnten Versuchen von Schatzmann an Erythrocyten darin liegen, daß Strophanthin den Rücktransport von Kalium-Ionen in die Zelle hinein hemmt. Dieser Rücktransport erfordert Energie, und so wäre die letzte Ursache der zur Lähmung des Muskels führenden Strophanthinwirkung möglicherweise in einer Hemmung energieliefernder Stoffwechselreaktionen zu erblicken. Im Einklang hiermit würde sodann stehen, daß die durch Strophanthin verursachte Hemmung der direkten Erregbarkeit des Zwerchfellmuskels sich schon durch kleine Adrenalindosen antagonistisch beeinflussen läßt, während Nor-adrenalin mit seiner weit schwächeren Stoffwechselwirkung (Holtz u. Mitarb.) selbst in 10fach höherer Dosierung kaum wirksam ist (siehe Abb. 5).

## Zusammenfassung.

Untersuchungen über den Mechanismus der nach hohen Strophanthindosen (150—300 $\gamma$/100 g s.c.) an Ratten auftretenden Lähmungen haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Von der Hemmungswirkung am M. gastrocnemius ist zuerst die indirekte, später auch die direkte Erregbarkeit betroffen.

2. Diese Hemmung der Muskelerregbarkeit durch Strophanthin läßt sich am isolierten Phrenicus-Zwerchfellpräparat der Ratte nur zeigen, wenn man den Kaliumgehalt der Tyrodelösung auf 30 mg-% erhöht.

3. Nach lähmenden Strophanthindosen kommt es am intakten Tier zu einer Erhöhung des Serumkaliumspiegels und zu einer Abnahme des Kaliumgehaltes der Muskulatur (M. gastrocnemius, Zwerchfell, Herz).

4. Für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der muskellähmenden Wirkung des Strophanthins und einer Abnahme des Kaliumgradienten spricht ferner, daß am Ganztier die Lähmung zum Zeitpunkt der stärksten Kaliämie auftritt. Am Zwerchfellpräparat wird die Strophanthinlähmung in gleicher Weise wie die durch hohe Kaliumkonzentrationen (50 mg-%) verursachte durch Adrenalin und Calcium-Ionen antagonistisch beeinflußt.

5. Die lähmende — und temperatursenkende — sowie die Kaliämie verursachende Wirkung ist beim k-Strophanthin fast doppelt so stark wie beim g-Strophanthin.

## Literatur.

Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Holtz, P., u. Mitarb.: Siehe z. B. Klin. Wschr. **1950**, 145. — Dtsch. med. Wschr. **1955**, 2. — Hotovy, R., u. H. Erdniss: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 204 (1949). — Hotovy, R., u. W. König: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 175 (1951). — Klupp, H., W. Kobinger u. O. Kraupp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 183 (1954). — Lendle, L.: Digitaliskörper und verwandte herzwirksame Glykoside. Handbuch d. exper. Pharmakol. Erg. Werk I (1935). — Klin. Wschr. **1934**, 86. — Lendle, L., u. D. Oldenburg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 243 (1950). — Masslow, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **111**, 114 (1926). — Neuschlosz, S. M.: Pflügers Arch. **197**, 235 (1922). — Santesson u. Strindberg: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **35**, 51 (1918), zit. n. L. Lendle. — Schatzmann, H. J.: Helvet. physiol. Acta **11**, 346 1953. — Schwartz, R., J. Cohen and W. M. Wallace: Amer. J. Physiol. **172**, 1 (1953). — Taugner, R., M. Taugner, Th. Lohmüller u. A. Fleckentsein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 219 (1949). — Weese, H.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg. **10**, 66 (1950). — Digitalis, Leipzig 1936. — Westermann, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 398 (1954). — Wilbrandt, W., u. R. Caviezel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 203 (1954).

Priv.-Doz. Dr. K. Greeff und Dr. E. Westermann, Frankfurt/Main, Pharmakol. Institut d. Univ., Ludwig-Rehn-Str. 14.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 114—119 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Göttingen
(Direktor: Professor Dr. R. Schoen).

# Lipoid-, Eiweiß- und Fermentaktivitätsuntersuchungen im Serum bei experimenteller Nierenschädigung durch Uranylnitrat.

Von
Günter Schulze, D. Winne und W. Zurmöhle.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 1. April 1955.)*

Uran ist seit etwa 100 Jahren als Nierengift bekannt[9] und ist oftmals, wie auch andere Schwermetalle, benutzt worden, um experimentelle Nierenschädigung zu erzeugen.

1928 ermittelte Eitel (unter Walther Straub), daß von den weichen Organen ausschließlich die Nierenrinde Uran speichert. Genauere Untersuchungen über seine Toxikologie sind jedoch erst durchgeführt worden, seitdem die gewerbliche Vergiftungsmöglichkeit im Rahmen der Plutoniumherstellung Bedeutung erlangt hat[14]. Durch diese neueren Arbeiten wurde klar erwiesen, daß das Uran selektiv im Knochen und in der Niere angereichert wird[5, 15, 17] und dabei zwischen $U^{233}$ und $U^{238}$ keine Unterschiede bestehen[16]. Ebenso bestätigten diese Arbeiten, daß in der Niere immer eine Schädigung des Tubulusapparates im Sinne einer nekrotisierenden Nephrose entsteht[18, 19], und der Glomerulusapparat an der Vergiftung offenbar weniger beteiligt ist, wenn auch dort Veränderungen vorkommen[19, 2].

Früher konnten wir nachweisen, daß es bei Nierenparenchymerkrankungen zu Veränderungen am Serumfett und am Serumeiweiß kommt, die um so ausgeprägter sind, je chronischer die Erkrankung ist, und bei den Nephrosen allgemein bekannt sind[12]. Die hier vorgelegten Untersuchungen hatten zum Ziel, festzustellen, ob die gefundenen Veränderungen unabhängig voneinander auftreten und bestehen, oder ob irgendwelche Beziehungen qualitativer oder quantitativer Art gefunden werden können.

## Methodik.

An Hunden wurde in Anlehnung an die Erfahrungen Egers eine chronische Uranylnitratvergiftung durchgeführt, wobei ihnen an jedem 4. Tag 0,14 mg $UO_2(NO_3)_2$ als 0,5%ige Lösung intravenös injiziert wurde. An den Tagen der Injektionen des Urans wurde vorher jeweils Blut durch Venenpunktion entnommen und darin der Gesamtfettgehalt und seine Verteilung[13], der Gesamteiweißgehalt und seine Unterfraktionen elektrophoretisch[1], sowie die saure und alkalische Phosphataseaktivität untersucht[8].

## Ergebnisse.

Alle in den Versuch genommenen Tiere zeigten übereinstimmend das Bild der typischen Uranvergiftung mit Albuminurie, die ihren Höhepunkt am Ende der ersten Woche hatte und danach nur noch sporadisch beobachtet wurde. Dazu wurden gelegentlich im Harn granulierte Zylinder und Erythrocyten gefunden. Bei fast allen Hunden wurde eine geringfügige und unregelmäßige Glucosurie beobachtet. Histologisch fanden wir an den Nieren das Bild der nekrotisierenden Nephrose mit herdförmiger Glomerulitis. An den Lebern wurde histologisch ein krankhafter Befund nicht erhoben, insbesondere wurde eine Leberverfettung nicht beobachtet. Während des Versuches war der körperliche Zustand der Tiere im wesentlichen unverändert.

Tabelle 1.

*Serumlipoidgehalt und -zusammensetzung bei chronischer $UO_2(NO_3)_2$-Vergiftung des Hundes (Mittelwerte aus 4 Versuchen).*

| | Vor $UO_2$ $(NO_3)_2$ | 1. 4. Tag | 2. 8. Tag | 3. 12. Tag | 4. 16. Tag | 5. 20. Tag | 6. 24. Tag | 7. 28. Tag | Nach $UO_2$ $(NO_3)_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gesamt-Lipoid mg% | 631,6 | 626,4 | 835,4 | 919.0 | 767,9 | 826,8 | 652,5 | 603,1 | 525,9 |
| $\sigma_M$ | 53,9 | 115,1 | 60,0 | 63,1 | 83,8 | 48,5 | 83,8 | 56,5 | |
| P< | | | 0,02 | 0,01 | | | | | |
| Phosphorlipoid mg% | 303,1 | 311,8 | 564,6 | 566,7 | 513,7 | 411,6 | 294,7 | 282,6 | 251,2 |
| $\sigma_M$ | 44,6 | 104,8 | 54,0 | 45,9 | 113,4 | 34,2 | 61,2 | 66,7 | |
| P< | | | 0,01 | 0,01 | | | | | |
| Cholesterin-Ester mg% | 122,6 | 119,2 | 113,7 | 187,3 | 124,8 | 175,6 | 145,5 | 209,8 | 112,6 |
| $\sigma_M$ | 14,5 | 15,5 | 33,2 | 51,3 | 10,8 | 24,1 | 19,2 | 102,2 | |
| Neutralfett mg% | 70,9 | 54,8 | 59,0 | 61,4 | 60,8 | 63,4 | 62,3 | 77,2 | 63,5 |
| $\sigma_M$ | 8,3 | 1,5 | 14,0 | 12,1 | 13,9 | 6,7 | 16,1 | 10,1 | |
| Freies Cholesterin mg% | 24,9 | 25,1 | 35,0 | 44,6 | 21,5 | 32,2 | 20,3 | 15,1 | 15,1 |
| Kohlenwasserstoffe u. Wachse mg% | 43,9 | 33,3 | 37,9 | 35,9 | 53,2 | 44,4 | 34,8 | 29,9 | 42,0 |
| Unbekannte Substanz mg% | 54,5 | 46,7 | 48,1 | 61,0 | 51,2 | 66,7 | 58,7 | 58,6 | 37,1 |

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen an den Serumlipoiden zeigt Tab. 1. In ihr sind die Werte für Gesamtlipoid, Phosphatid, Cholesterin-Ester und Neutralfett in mg% des Serums einschließlich ihrer Standardabweichungen angegeben. Wenn in Abhängigkeit von der Giftzufuhr Veränderungen auftraten, die Signifikanz erreichten, ist zusätzlich der Wert für P angegeben (vgl. PAETAU). Die Fraktionen des freien Cholesterins, der Kohlenwasserstoffe und Wachse und die der unbekannten Substanz erfuhren im Verlauf der Vergiftung nur geringe Veränderungen,

so daß hier die statistische Auwsertung unterlassen wurde. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß es im Verlauf der Vergiftung mit Uranylnitrat zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtfettes im Serum kommt, wofür im wesentlichen ein Anstieg der Phosphatide verantwortlich ist. Trotz weiterer Giftzufuhr kehren die Veränderungen zur Norm zurück.

Die prinzipiellen Regulationsmechanismen des Serumlipoidgleichgewichtes[11] sind jedoch nicht gestört, wie die Abb. 1 zeigt, in der die Werte für Phosphatid, Cholesterin-Ester und Neutralfett in % der

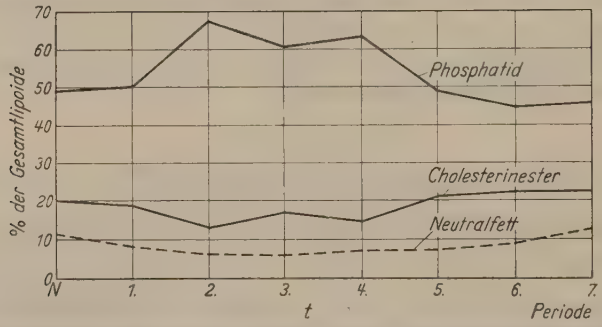



Abb. 1. Verhalten der Phosphatide, Cholesterin-Ester und des Neutralfettes im Serum bei chronischer $UO_2(NO_3)_2$-Vergiftung.

Gesamtlipoide ausgedrückt sind. Die gegensinnige Regulation von Phosphatiden und Cholesterin-Estern ist über den ganzen Zeitraum der Untersuchung voll erhalten.

Ebenso wie die Serumlipoide nehmen auch die Serumeiweiße an dem Vergiftungsvorgang teil, wie Tab. 2 deutlich macht. Zwar erfährt der

Tabelle 2.

*Serumeiweißgehalt und -zusammensetzung bei chronischer $UO_2(NO_3)_2$-Vergiftung des Hundes (Mittelwerte aus 4 Versuchen).*

| | | Vor $UO_2(NO_3)_2$ | 1. 4. Tag | 2. 8. Tag | 3. 12. Tag | 4. 16. Tag | 5. 20. Tag | 6. 24. Tag | 7. 28. Tag | $\frac{\Sigma 1-7}{7}$ | P< |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gesamt-Eiweiß | | | | | | | | | | | |
| | g% | 7,55 | 7,17 | 7,00 | 6,97 | 6,78 | 7,08 | 7,15 | 6,92 | 7,05 | 0,10 |
| | $\sigma_M$ | 0,24 | | | | | | | | 0,187 | |
| Albumin | g% | 4,22 | 3,69 | 3,32 | 2,89 | 2,99 | 3,27 | 2,85 | 2,88 | 3,13 | |
| | $\sigma_M$ | 0,18 | | | | | | | | 0,14 | 0,001 |
| a-Globulin | g% | 1,09 | 0,98 | 1,31 | 1,04 | 1,14 | 1,22 | 1,15 | 0,99 | 1,13 | |
| | $\sigma_M$ | 0,03 | | | | | | | | 0,075 | 0,74 |
| b-Globulin | g% | 1,39 | 1,63 | 1,88 | 2,08 | 1,77 | 1,63 | 2.02 | 2,04 | 1,85 | |
| | $\sigma_M$ | 0,06 | | | | | | | | 0,071 | 0,001 |
| g-Globulin | g% | 0,84 | 0,87 | 0,83 | 0,95 | 0,84 | 0,96 | 1,12 | 1,20 | 0,96 | |
| | $\sigma_M$ | 0,05 | | | | | | | | 0,044 | 0,1 |

Gesamteiweißgehalt des Serums keine signifikanten Veränderungen, in den Eiweißfraktionen jedoch werden Verschiebungen beobachtet, die einer signifikanten Albuminabnahme und einem Anwachsen des $\beta$-Globulins entsprechen.

Anders verhalten sich die Aktivitäten der alkalischen und sauren Serumphosphatasen. Die Werte für die alkalische Phosphataseaktivität (Tab. 3) sind bei den einzelnen Versuchstieren vor Beginn der Ver-

Tabelle 3.

*Verhalten der alkalischen Phosphataseaktivität im Serum bei chronischer $UO_2(NO_3)_2$-Vergiftung* (King-Armstrong-*Einheiten*).

| | | Vor $UO_2(NO_3)_2$ | 1. 4. Tag | 2. 8. Tag | 3. 12. Tag | 4. 16. Tag | 5. 20. Tag | 6. 24. Tag | 7. 28. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hund A | KAE | 14,5 | 25,6 | 44,7 | 33,1 | 18,4 | 17,8 | 22,6 | 24,2 |
| Hund B | KAE | 9,03 | 6,93 | 3,99 | 3,80 | 1,49 | 2,02 | 1,02 | 0,95 |
| Hund C | KAE | 3,13 | 2,71 | 7,74 | 5,81 | 2,76 | 2,46 | 2,72 | 1,83 |
| Hund D | KAE | 1,19 | 1,03 | 1,78 | 1,29 | 1,76 | 1,34 | 0,84 | 1,26 |

giftung starken individuellen Schwankungen unterworfen. Die einzelnen Tiere jedoch halten im Verlaufe des Experimentes etwa ihr Ausgangsniveau bei. Es kommt hier zu signifikanten Veränderungen der Aktivität, die ihr Maximum am 8. und 12. Tag nach Beginn der Vergiftung haben, jedoch sind die Abweichungen gegenüber dem Ausgangswert nur bei 2 von 4 Tieren deutlich ($P < 0{,}01$).

Ähnlich verhalten sich auch die Aktivitäten der sauren Serumphosphatasen (Tab. 4), die ähnliche Schwankungen in der Ausgangslage

Tabelle 4.

*Verhalten der sauren Phosphataseaktivität im Serum bei chronischer $NO_2(NO_3)_2$-Vergiftung* (Gutman-*Einheiten*).

| | | Vor $UO_2(NO_3)_2$ | 1. 4. Tag | 2. 8. Tag | 3. 12. Tag | 4. 16. Tag | 5. 20. Tag | 6. 24. Tag | 7. 28. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hund A | GE | 2,26 | 5,23 | 4,09 | 2,12 | 4,88 | 1,09 | — | 2,91 |
| Hund B | Gz | 1,39 | 1,93 | 3,04 | 2,55 | 0,61 | 0,0 | 0,0 | 0,65 |
| Hund C | GE | 0,43 | 0,62 | 0,32 | 0,03 | 0,56 | 1,19 | 2,19 | 0,82 |
| Hund D | GE | 0,45 | 0,0 | 0,12 | 0,43 | 0,52 | 0,99 | 2,76 | 0,37 |

zeigen wie die der alkalischen. Signifikante Abweichungen vom Ruhewert im Verlauf des Experimentes sind hier jedoch nicht vorhanden. Maxima der sauren Phosphataseaktivität im Serum liegen etwa am 8. und am 24. Tag nach Beginn der Vergiftung.

## Diskussion der Ergebnisse.

In Übereinstimmung mit Eger sind die von uns beschriebenen Erscheinungen der Vergiftung passager, so daß man Veränderungen beobachten kann, die durch das Auftreten und das Abklingen eines Nierenparenchymschadens bedingt sind.

Die Serumeiweiße zeigen im Verlauf der Vergiftung Veränderungen komplizierterer Art als die Serumlipoide. Mit zunehmender Dauer der Vergiftung kommt es zu fortschreitender Albuminabnahme und stetiger $\beta$-Globulinzunahme, während Gesamteiweiß, $\alpha$- und $\beta$-Globulin an dem Geschehen nicht nachweisbar teilnahmen. Eine echte Correlation zwischen Eiweiß- und Lipoidveränderungen im Serum, wobei im Verlauf der Vergiftung letztere einmalig ansteigen und wieder abfallen, ist nicht vorhanden. Die Veränderungen bestehen offenbar unabhängig voneinander, wenn es auch so scheint, als ob sie etwa gleichzeitig mit Eintritt der Nierenparenchymschädigung ausgelöst würden. Während die Lipoidveränderungen im Serum offenbar weitgehend der Nierenfunktion angepaßt sind, sind die Eiweißveränderungen weitgehend unabhängig davon, so daß die Vermutung naheliegt, daß die Serumlipoide unmittelbar von der Niere aus beeinflußbar sind, während ein Einfluß auf die Serumeiweiße vielleicht nur mittelbar ausgeübt werden kann.

Ob die Beeinflussung des Serumlipoidgehaltes und seiner Zusammensetzung unter besonderer Beteiligung der Phosphatide über eine Aktivitätssteigerung der Serumphosphatasen ausgelöst wird, kann nicht sicher entschieden werden, jedoch spricht eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, daß dem Anstieg der Serumphosphatide eine Aktivitätssteigerung der alkalischen Serumphosphatase correliert ist. Wenn in unseren Versuchen die Veränderungen der Phosphataseaktivität nicht die gleiche Signifikanz aufweisen wie die der Lipoide und Eiweißkörper, mag es auf die Beobachtung zurückzuführen sein, daß die Änderung der Phosphataseaktivität von der zugeführten Dosis an $UO_2(NO_2)_2$ abhängig sein kann. Ob die im Serum beobachteten Aktivitätsänderungen der Phophatase im Zusammenhang stehen mit den in der Niere selbst ablaufenden Aktivitätsänderungen[6, 7, 3], kann an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden. Ebenso bleibt die Stellung der sauren Phosphataseaktivität in dem Zusammenspiel der Veränderungen offen, wenn es auch den Anschein hat, daß ihre Aktivität insofern der alkalischen correliert ist, daß vor und nach der Aktivierung der alkalischen Phosphatase eine kurzdauernde Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase erfolgt.

## Zusammenfassung.

1. An Hunden wurde durch mehrfache Gabe der gleichen, kleinen Dosis von Uranylnitrat eine vorwiegend tubuläre Nierenparenchymschädigung herbeigeführt. Dabei kommt es zu einem einmaligen An- und Abschwellen der klinischen Erscheinungen.

2. Gesamtlipoid und Phosphatid steigen signifikant an, während die Albumine absinken und $\beta$-Globuline ansteigen. Auch an den Phosphataseaktivitäten lassen sich signifikante Veränderungen nachweisen.

3. Die zeitlichen Correlationen der gefundenen Veränderungen wurden untersucht und gefunden, daß keine Correlation besteht zwischen Eiweiß- und Lipoidveränderungen, der Phosphatidanstieg jedoch einer Aktivitätssteigerung der alkalischen Serumphosphatase zugeordnet ist.

## Literatur.

[1] Antweiler, H. J.: Die quantitative Elektrophorese in der Medizin. Berlin: Springer 1952. — [2] Baehr, G.: Beitr. path. Anat. **55**, 545 (1913). — [3] Breedis, C., C. M. Flory and J. Furth: Arch. of Path. **36**, 402 (1943). — [4] Eger, W.: Virchows Arch. **306**, 183 (1940). — Frankf. Z. Path. **56**, 370 (1942). — [4a] Eitel, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **135**, 188 (1928). — [5] Feretti, R. J., and S. Schwarz: Metallurgical Laboratory Report CH-3593 Sept. 11. (1946(. — [6] Hepler, O., H. Gurley and J. P. Simonds: Arch. of Path. **39**, 133 (1945). — [7] Hepler, O., and J. P. Simonds: Arch. of Path. **41**, 42 (1946). — [8] Kirberger, E., u. G. A. Martin: Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 268 (1950). — [9] Leconte, M.: Gaz. med. Paris **9**, 196 (1854). — [10] Paetau, K.: Biol. Zbl. **63**, 152 (1943). — [11] Schulze, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 473 (1952). — [12] Schulze, G., u. F. Hartmann: Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 58. Kongr., S. 300 (1952). — [13] Schulze, G., u. H. Südhof: Pflügers Arch. **258**, 211 (1953). — [14] Tannenbaum, A.: National Nuclear Energy Series, Manhattan Projekt, Technical Section, Division IV, Plutonium Projekt Report, Vol. 23, Toxikology of Uranium. New York: Mac Graw-Hill Book Company 1951. — [15] Tannenbaum, A.: Metallurgical Laboratory Report CH-2446 Dec. 7. (1944). — [16] Tannenbaum, A., and J. Koziol: Metallurgical Laboratory Report MuC-RSS Oct. (1945). — [17] Tannenbaum, A.: Metallurgical, Laboratory Report CH-3659 Dec. 31. (1946). — [18] Tannenbaum, A.: Metallurgical Laboratory Report CH-3696 Febr. 28. (1947). — [19] Wachstein, M.: J. of Exper. Med. **84**, 25 (1945).

Priv. Doz. Dr. Günter Schulze, Med. Univ.-Klinik Göttingen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 120—129 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn).

# Über die Bedeutung zentraler Faktoren für die Blutdruckwirkungen von Nicotinsäurediäthylamid (Coramin).

Von
H. Giertz, F. Hahn und W. Rummel.

Mit 6 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 1. April 1955.)*

Zentrale Analeptica können bekanntlich neben ihren blutdrucksteigernden auch blutdrucksenkende Wirkungen haben. Besonderes Interesse beansprucht in dieser Hinsicht das Coramin, weil seine depressorischen Eigenschaften je nach den Versuchsbedingungen (Tierart, Narkose) sehr wechseln und auf einen zentralen Entstehungsmechanismus hindeuten. Auch andere Analeptica wie Cardiazol und Pikrotoxin können ähnlich wirken; doch sind unter bestimmten Bedingungen (z. B. Katzen in Chloralosenarkose) die depressorischen Eigenschaften des Coramin stärker ausgeprägt (Hahn 2).

Als zentralen Mechanismus haben Gollwitzer-Meier, ferner Massart eine Reizung des Vaguszentrums in Betracht gezogen. Auf diese deutet auch die Bradykardie bei Hunden (Faust, Massart), wo das Coramin anscheinend ebenfalls leicht blutdrucksenkend wirkt (Feger; Russu u. Sparchez; Massart; Regniers u. Vleeschhouwer). Umgekehrt läßt sich die größere Konstanz pressorischer Coraminwirkung beim Kaninchen (Hahn u. Simon; Bein u. Meier) mit dem geringeren Vagustonus dieser Tierart in Verbindung bringen. Allerdings bleiben die blutdrucksenkenden Coraminwirkungen bei Katzen in Chloralosenarkose auch nach Vagotomie erhalten. Trotzdem kann, wie Hahn u. Rummel sowie Hahn, Plester u. Rummel gezeigt haben, an einem zentralen Entstehungsmechanismus festgehalten werden.

Wie im folgenden noch näher begründet werden soll, ist damit die Beteiligung peripherer Faktoren nicht ausgeschlossen. Es kommen direkte dilatierende Gefäßwirkungen des Coramin (Uhlmann, Massart, Myers) in Frage, für die wir selbst (Hahn u. Simon) durch den Nachweis adrenalinhemmender Coraminwirkungen am isolierten Gefäßstreifen einen Beitrag geliefert haben. Massart zieht außerdem eine direkte hemmende Herzwirkung in Betracht.

Serin vermochte die Coraminwirkungen bei Katzen und Kaninchen durch einen Ganglienblocker (Hexamethonium) nicht zu beeinflussen, ohne jedoch entscheiden zu können, ob sie zentral oder peripher bedingt sind, Er zieht aber auch die Beweiskraft des von uns für den zentralen Mechanismus der depressorischen Coraminwirkung vorgebrachten Arguments,

nämlich der stärkeren Wirkung nach Injektion in die Arteria vertebralis statt in die Vene, in Zweifel, da es sich hierbei um einen unspezifischen Vorgang infolge der starken Coraminkonzentrierung in der Medulla oblongata handeln könne. Dieser uns wenig einleuchtende Einwand erscheint allein schon durch die Abgrenzbarkeit der Coraminwirkung von der Wirkung verschiedener anderer Analeptica nicht zutreffend. Es sprechen aber vor allem quantitative, ferner auch zeitliche Faktoren dafür, daß der mit intravertebralen Injektionen ausgelöste zentrale Mechanismus auch bei intravenöser Zufuhr wirksam sein muß. So genügt nach unseren neueren Feststellungen $^1/_5$—$^1/_8$ der intravenös wirksamen Coramindosis, um auf intravertebralem Wege die gleiche Blutdruck-

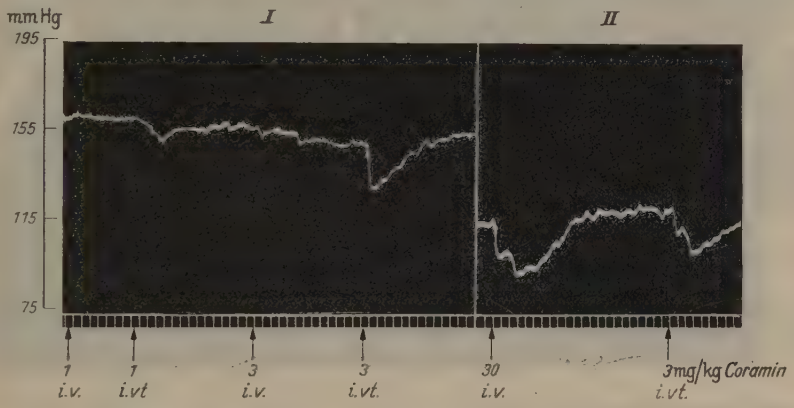



Abb. 1. Katze I: 2,8 kg ♀. Katze II: 2,4 kg. Je 100 mg/kg Chloralose. Carotissinus denerviert. Vagotomie. Künstliche Atmung. *i.v.* intravenös; *i.vt.* intravertebral. Zeit: 30 sec.

senkung zu erhalten, ein Bruchteil, der auch bei intravenöser Injektion von Coramin ins Gehirn gelangen dürfte. Zudem beträgt die von uns bestimmte intravertebrale Schwellendosis nur 0,5—1 mg/kg, was gemessen an den von SERIN (50 mg/kg!) und auch sonst bisweilen angewandten intravenösen Dosen einen noch kleineren Bruchteil bedeutet. Beispiele für den Unterschied der Wirksamkeit intravenöser und intravertebraler Injektionen zeigt Abb. 1.

Die Versuche in dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders vermerkt, an Katzen in Chloralosenarkose durchgeführt. Die Chloralose wurde 5%ig in 25%igem Urethan gelöst. Die Nn. vagi wurden durchtrennt und der Carotissinus durch Denervierung oder Carotisabklemmung ausgeschaltet. Künstliche Atmung und Messung des Blutdruckes mit dem Quecksilbermanometer und der TRENDELENBURGschen Gegenstrominfusion von Sodalösung. Die Blutdruckkanüle saß entweder in der Art. femoralis oder der Carotis. Die Injektionen erfolgten in die Vena femoralis und in besonderen Fällen auch in die Art. vertebralis.

In allen Versuchen haben wir uns auch durch NaCl-Injektionen gleichen Volumens (etwa 0,3 $cm^3$ absolut) von der Spezifität der Coraminwirkung überzeugt. Die Coraminverdünnungen erfolgten ebenfalls in NaCl. Zur Vermeidung brüsker

Konzentrierung des Coramin im Gehirn wurde das Coramin stets von der Brachialis in das zur Vertebralis hinströmende Blut injiziert (vgl. die von Hahn u. Rummel beschriebene Methodik).

Die zentrale Blutdruckwirkung des Coramin nach intravertebraler Injektion besteht nicht immer in einer reinen Senkung. Es kann der Senkung eine Steigerung vorausgehen oder in selteneren Fällen diese auch allein vorhanden sein. In Abb. 2 (vgl. die ersten zwei Kurvenzüge) herrscht bei einer Katze, deren Zentrum auf eine pressorische Coramin-

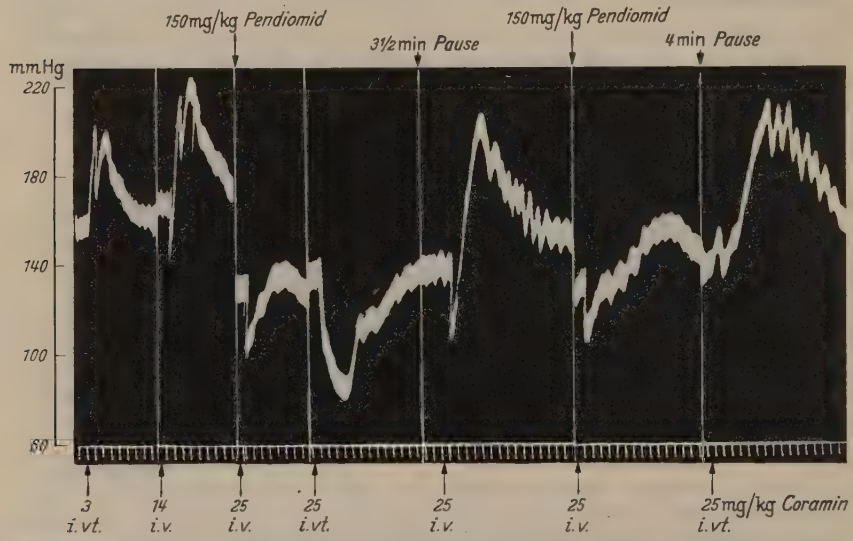



Abb. 2. Katze 4 kg ♀. 100 mg/kg Chloralose. Carotiden abgeklemmt. Vagotomie. Künstliche Atmung. *i.v.* intravenös; *i.vt.* intravertebral; Zeit: 30 sec.

wirkung eingestellt war, auch intravenös diese Wirkung bei einer etwa 5fach höheren Dosis vor. Der Kurvenverlauf ahmt sogar auffallend genau den Effekt der intravertebralen Injektion nach, lediglich zeitlich entsprechend dem längeren Weg verschoben. Der einzige Unterschied ist eine flüchtige initiale Blutdrucksenkung. Diese deutet aber auf eine accessorische periphere Komponente bei intravenöser Zufuhr hin. In Anbetracht der zeitlichen Verhältnisse und der mit der initialen Senkung verbundenen Bradykardie könnte eine direkte Wirkung auf das Herz dabei eine Rolle spielen.

Auch in Abb. 3 hebt sich der intravenöse Effekt der höheren Coramindosis (24 mg/kg) von der Wirkung einer 8fach kleineren intravertebralen Coramindosis nur durch eine initiale Blutdrucksenkung ab. Die anschließende Blutdrucksteigerung mit nochmaliger Blutdrucksenkung entspricht dem biphasischen zentralen Effekt. Die intravenös-depressorische Coraminwirkung ist hier also sichtbar in zwei Komponenten zerlegt,

von denen wir den ersten als peripher, den zweiten als zentral ansehen. Dieser unterschiedlichen Genese entspricht eine verschiedene Schwellendosis. Die kleinere Coramingabe (18 mg/kg) löst praktisch nur den ersten Blutdruckabfall aus, während die zweite Phase nur angedeutet ist.

In Abb. 1 sind schließlich Fälle wiedergegeben, wo beim Fehlen einer intravertebral nachweisbaren pressorischen Wirkung auch intravenös nur Blutdrucksenkungen auftraten. Nach dem Vorausgehenden muß man aber annehmen, daß hier der intravenöse Effekt durch Verschmelzung einer zentralen und einer peripheren Komponente zustande gekommen sein kann.

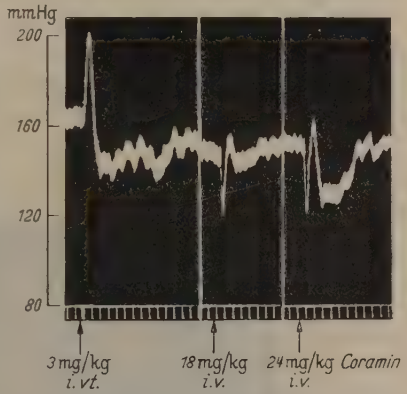



Abb. 3. Katze 2,3 kg ♂, 100 mg/kg Chloralose. Carotiden abgeklemmt. Vagotomie. Künstliche Atmung. *i.v.* intravenös; *i.vt.* intravertebral. Zeit: 30 sec.

Die Beteiligung einer peripheren Komponente an der Blutdrucksenkung durch intravenöse Coramingaben könnte die Ursache dafür sein, daß Serin diese Wirkung durch Ganglienblockade nicht aufheben konnte. Die Frage ist nur, ob der zentrale Effekt blockierbar ist. Eigentümlicherweise hat nämlich Serin auch keine Beeinflussung der pressorischen Coraminwirkung durch die Blockade erzielt. Es muß daher auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die zentralen Coraminwirkungen über nicht blockierbare Bahnen verlaufen, wenn man nicht annehmen will, daß auch an der pressorischen Wirkung periphere Ursachen beteiligt sind. Mit der intravertebralen Injektionstechnik haben wir diese Frage geprüft.

Wir blockierten mit Pendiomid (N, N, N′, N′-3-Pentamethyl-N, N′-diäthyl-3-aza-pentylen-1,5-diammonium), von dem wir intravenös nicht nur Dosen gaben, die zur Aufhebung elektrischer Vagusreize sicher ausreichten (10 mg/kg), sondern auch wesentlich höhere Dosen (50—150 mg/kg, eventuell mehrmals). Wie Abb. 2 zeigt, läßt sich die blutdrucksteigernde Coraminwirkung durch Pendiomid aufheben, nicht nur bei intravertebraler, sondern auch bei intravenöser Injektion. Die blutdrucksteigernde Wirkung bleibt trotz Erhöhung der Coramindosen (intravertebral bis auf das über 8fache) vollständig aus.

Bemerkenswert ist nun aber, daß schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit trotz der hohen Pendiomiddosis die blutdrucksteigernde Wirkung der zweiten intravenösen Coramingabe wieder voll ausgeprägt ist. Hier ist also, wahrscheinlich begünstigt durch die vorausgehenden Coramininjektionen, die Blockade durchbrochen. Als Zeichen dafür kann auch

die Beobachtung dienen, daß der Blutdruck nicht mehr zur Ausgangsbasis zurückkehrte und erst durch eine neue Pendiomidzufuhr wieder auf das Niveau gesenkt werden konnte, das der maximalen Pendiomidwirkung entsprach. Danach ist auch die intravenöse Coraminwirkung wieder gehemmt, wenn auch nicht mehr vollständig, und schon die folgende intravertebrale Gabe hat wieder einen starken und reinen pressorischen Effekt.

Offenbar wurde hier die Blockade rascher durchbrochen als nach der ersten Pendiomidinjektion, und zwar wohl deshalb, weil der deblockierende Einfluß der vorausgehenden Coramingaben noch nachwirkte.

Die depressorische Komponente der intravenösen Coraminwirkung verschwindet in Abb. 2 durch die Blockade nicht. Aber auch bei intra-

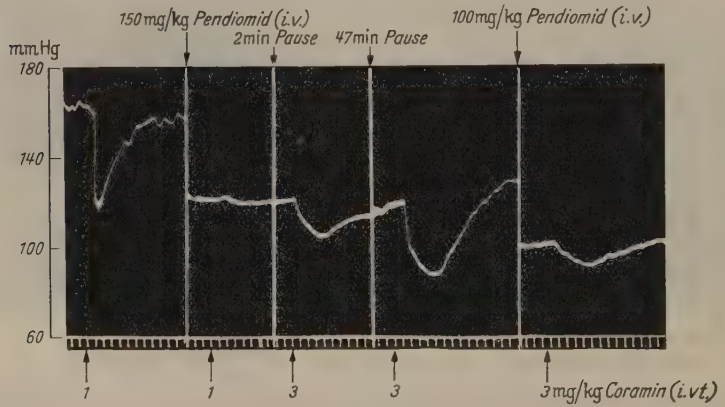



Abb. 4. Katze 2,0 kg ♀. 100 mg/kg Chloralose. Carotiden abgeklemmt. Vagotomie. Künstliche Atmung. *i.v.* intravenös; *i.vt.* intravertebral. Zeit: 30 sec.

vertebraler Injektion tritt bei vollständiger Blockade an Stelle der pressorischen Wirkung eine vorher nicht nachweisbare senkende Wirkung von stärkerem Grade als intravenös auf, die bei Nachlassen der Blockade am Schluß des Versuchs wieder einer blutdrucksteigernden Wirkung Platz macht. Hier deckt also die Blockade durch Auslöschen einer überlagernden pressorischen Wirkungskomponente erst die zentrale depressorische Komponente auf, was auf eine größere Resistenz dieser Komponente gegenüber blockierenden Einflüssen schließen läßt. Nur im Bereich kleiner, schwellennaher Coramindosen (z. B. 1 mg/kg) war ein antagonistischer Effekt des Pendiomid auch gegenüber den zentral bedingten Blutdrucksenkungen bei intravertebraler Injektion nachweisbar (Abb. 4). Die Dosiserhöhung von 1 mg/kg auf 3 mg/kg genügt, um die blutdrucksenkende Wirkung wieder in Erscheinung treten zu lassen. Auch diese ist, da die gleiche Dosis intravenös wirkungslos war, als zentral anzusehen. Nach einem Intervall von etwa $^3/_4$ Std, das durch

einige, in der Abb. 4 nicht verzeichnete intravenöse Coramintestungen ausgefüllt war, hat die intravertebrale Wirkung der gleichen Dosis mächtig zugenommen. An die stärkere Blutdrucksenkung schließt sich hier sogar eine deutliche Blutdrucksteigerung an, die wieder die deblockierende Coraminwirkung deutlich zur Darstellung bringt. Diese Blutdrucksteigerung blieb bestehen und konnte erst durch eine nochmalige Pendiomidgabe wieder rückgängig gemacht werden. Mit der nunmehr wieder maximalen Blockade ist die zentrale blutdrucksenkende Coraminwirkung wieder stark reduziert, ohne aufgehoben zu sein.

Nach diesen Untersuchungen steht es fest, daß die zentrale Coraminwirkung einem antagonistischen Einfluß der Ganglienblockade unterliegt, der beide Wirkungskomponenten, aber in sehr unterschiedlichem Grade, betrifft. Der Antagonismus erscheint reziprok, da er durch erhöhte oder wiederholte Coramingaben zu durchbrechen ist und dieser Effekt durch erneute Pendiomidzufuhr wieder rückgängig gemacht werden kann.

Das Vorhandensein eines reziproken Antagonismus würde es auch verständlich machen, daß Serin der Einfluß der Ganglienblockade auf die pressorische Coraminwirkung entgangen ist, da er nur mit verhältnismäßig niedrigen Ganglienblockerdosen arbeitete. Für die blutdrucksenkende Wirkung höherer intravenöser Coramingaben (20—50 mg/kg) können wir zwar bestätigen, daß sie auch mit höheren Pendiomiddosen nicht sicher zu beeinflussen sind. Damit ist aber die Bedeutung einer zentralen Komponente nicht ausgeschlossen, selbst wenn wir die eingangs erwähnten quantitativen Argumente einmal außer Acht lassen. Erstens hat sich die zentraldepressorische Coraminwirkung auch mit hohen Pendiomiddosen nur als unvollständig hemmbar erwiesen, zweitens wird durch die bessere Blockierbarkeit der pressorischen Wirkung eine Verschiebung innerhalb der zentralen Wirkungen zugunsten der depressorischen Komponente erreicht. Es kann dadurch sogar zu einer Begünstigung depressorischer Coraminwirkungen kommen, die wir in Abb. 2 für die intravertebrale, in anderen Versuchen auch für die intravenöse Injektion nachweisen konnten.

Die große Labilität der Coraminwirkung, die schon unter scheinbar konstanten Versuchsbedingungen zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 1 bis 3), zeigt sich in besonderem Maße in der Abhängigkeit von den narkotischen Faktoren. Wie wir jetzt feststellen konnten, überwiegt bei der Katze in der Urethannarkose im Gegensatz zur Chloralosenarkose die pressorische Coraminwirkung. Propft man jedoch einer Urethannarkose eine Chloralosenarkose auf, so schlägt sofort die Coraminwirkung nach der depressorischen Seite um (Abb. 5). Das Coramin hebt sich dabei deutlich vom Cardiazol ab (vgl. hierzu auch Hahn 1). Wir erblicken hierin einen weiteren Beweis für einen zentralen Entstehungsmechanismus der depressorischen Coraminwirkung; denn es besteht eine auffallende Parallele zwischen dem jetzigen Befund und den früheren Erhebungen (Hahn u. Rummel) über die Wirkung der Chloralose auf kleine intravertebrale Coramingaben. Danach darf man annehmen, daß es auch bei

intravenöser Injektion eine zentral-depressorische Wirkungskomponente sein muß, der die Chloralose zum Durchbruch verhilft.

Um den Sitz der depressorischen Zentren kennenzulernen, wurden Katzen in Chloralosenarkose decerebriert. Bei nicht zu stark abgefallenem Blutdruck blieb meist die depressorische Coraminwirkung erhalten (Abb. 6). Auf einer mangelhaften Ansprechbarkeit der pressorischen Zentren infolge der Decerebrierung kann dieser Effekt kaum beruhen, da das Cardiazol seine blutdrucksteigernde Wirksamkeit dabei behalten

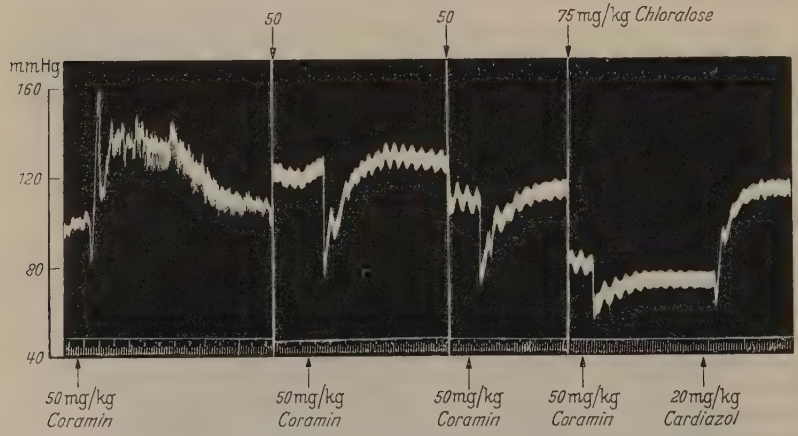



Abb. 5. Katze 5 kg ♂. 1,75 g/kg Urethan. Künstliche Atmung. Alle Injektionen intravenös.

hat. Nach Decerebrierung in Äthernarkose ohne Chloralose herrscht die blutdrucksteigernde Coraminwirkung vor, wie wir in Übereinstimmung mit van Esveld nachweisen konnten. Somit ist auch nach Decerebrierung der differenzierende Einfluß der Chloralosenarkose auf Cardiazol und Coramin vorhanden. Auch die blutdrucksteigernde Wirkung kleiner Chloralosegaben, die wir als Begleiterscheinung der zentralen Umstimmung immer wieder finden (vgl. Abb. 5), konnten wir am decerebrierten Tier nachweisen.

Legt man jedoch den Schnitt durch Dekapitierung der Katzen unterhalb der Medulla oblongata, so ändert sich die Wirkung der Chloralose. Wie wir früher (Hahn 3) zeigten, wird hier am leichtesten die pressorische Cardiazolwirkung ausgelöscht. Wird auch die pressorische Coraminwirkung unterdrückt, so treten an ihre Stelle wieder Blutdrucksenkungen, die stärker als beim Cardiazol sind. Diese können jedoch auch ohne Chloralosenarkose auftreten, wie aus den Versuchen von Zinnitz u. von Bergmann hervorgeht, und sind daher vielleicht nur peripher bedingt.

Es ist durch die Decerebrierungsversuche nicht gelungen, die depressorischen Zentren scharf zu lokalisieren. Wahrscheinlich kommen sowohl Areale oberhalb als auch unterhalb der Decerebrierungsebene (Mittelhirn) in Betracht.

## Besprechung der Ergebnisse.

Während für die blutdrucksenkende Coraminwirkung neben einer zentralen auch eine periphere Komponente angenommen werden kann, sind für die blutdrucksteigernde Coraminwirkung nur zentrale Angriffspunkte in Betracht zu ziehen. Auch die deblockierende Coraminwirkung macht die Annahme einer direkten Wirkung auf die Ganglien nicht erforderlich. Es genügt die Vorstellung, daß die Erregung der pressorischen Zentren zu den Ganglien fortgeleitet und dort durch Reiz-

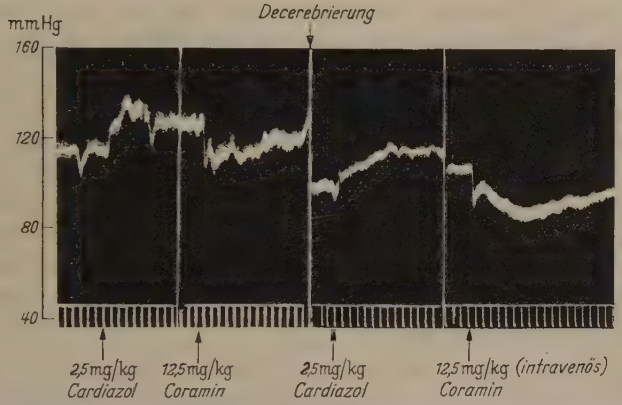



Abb. 6. Katze 3,0 kg ♀. 75 mg/kg Chloralose. Carotiden abgeklemmt. Vagotomie. Künstliche Atmung. Zeit: 30 sec.

summation deblockierend wirksam werden kann. Gleichzeitig mit der Herstellung der Erregungsleitung kann sich auch wieder der hemmende Effekt bemerkbar machen, der von den depressorischen Zentren auf die pressorischen ausgeübt wird und nach unserer Auffassung so indirekt die Ursache der Blutdrucksenkungen auch an vagotomierten Tieren sein kann. Es bestehen aber außerdem Hinweise auf besondere sympathische cholinergische vasodilatorische Bahnen (Eliasson, Folkow, Lindgren, Uvnäs).

Durch die Feststellung eines reziproken Antagonismus zwischen Coramin und Pendiomid geben wir unseren Befunden eine andere Deutung als Heim u. Wagner ihren in gewisser Hinsicht verwandten Befunden. Sie fanden, daß die zentrale $CO_2$-Wirkung auf den Blutdruck durch Pendiomid nicht aufgehoben wird und nehmen für sie nichtblockierbare arterenergische Nervenbahnen an. Leider liegen keine Untersuchungen über die Wirkung der Sympathicolytica auf Coramin vor, abgesehen von einer Angabe von Bein u. Meier über die Wirkung des Regitin.

Die geschilderte Wirkung auf Cardiazol und Coramin unterscheidet die Chloralose nicht nur vom Urethan, welches die blutdrucksteigernde Coraminwirkung begünstigt, sondern in einer anderen Hinsicht auch von den Barbituraten, die die pressorische Wirkung auch des Cardiazols hemmen und ins Gegenteil verkehren können (Hahn, Plester u. Rummel). Auch auf die pressorische Wirkung der Carotissinusreizung wirkt die Chloralose fördernd und die Barbiturate hemmend (Neil,

Redwood u. Schweitzer). Auf die Förderung physiologischer pressorischer Impulse deutet die blutdrucksteigernde Wirkung hin.

Da die typische Wirkung von Chloralose auf Cardiazol und Coramin an der intakten und decerebrierten Katze nicht mehr an der nur metamer versorgten Spinalkatze nachweisbar ist, so erscheint sie an höhere Zentren gebunden. Sie ist außerdem von artspezifischen Unterschieden im Organisationszustand des ZNS abhängig; denn an Kaninchen wirkt Coramin wie Cardiazol auch in Chloralosenarkose hauptsächlich blutdrucksteigernd (Hahn u. Simon; Hahn, Plester u. Rummel). Unter dem Einfluß der Chloralose verschiebt sich bei der Katze der Gleichgewichtszustand des übergeordneten, dualistischen Blutdruckregulationssystems. Zugleich tritt eine erhöhte Labilisierung des Systems ein, wodurch die Ausschläge nach beiden Seiten je nach der Natur des Analepticums stärker werden. Diese erhöhte Empfindlichkeit des Systems zeigt sich auch darin, daß namentlich bei der Katze unter Chloralose die blutdruckwirksamen Dosen von Cardiazol niedriger liegen als unter Urethan. In Tab. 1 geben wir auf Grund größerer Versuchsreihen eine Zusammenstellung der wirksamen Dosen von Cardiazol und Coramin in Abhängigkeit von Tierart und Narkose wieder, die sicher auch von allgemeinem Interesse sein dürfte.

Tabelle 1. *Intravenöse blutdrucksteigernde Dosen von Cardiazol und Coramin.*

| | | Katze (mg/kg) | | Kaninchen (mg/kg) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Urethan | Chloralose | Urethan | Chloralose |
| Cardiazol | Schwellendosen | 8—10 | 0,5—2 | 9 —17 | 5 |
| | gut wirksame Dosen | 25 | 4—7 | 20—25 | 10—20 |
| Coramin | Schwellendosen | 10—25 | (10)[1] | ? | ? |
| | gut wirksame Dosen | 50 | (18)[1] | 20—50 | 20—50 |

[1] Sehr häufige Blutdrucksenkungen.

## Zusammenfassung.

1. Bei vagotomierten und entzügelten Katzen überwiegt in Chloralosenarkose die blutdrucksenkende, in Urethannarkose die blutdrucksteigernde Wirkung intravenöser Coramingaben.

2. Der Schwellenwert für die blutdrucksenkende Wirkung des Coramin liegt intravenös 5—8mal höher als intravertebral, wo er 0,5 bis 1 mg/kg beträgt.

3. Die intravenöse Coraminwirkung ahmt ziemlich genau die jeweilig intravertebrale Wirkung nach, abgesehen von einem initialen, depressorischen intravenösen Effekt, der als peripher bedingt (Herzwirkung?) angesehen wird.

4. Die blutdrucksteigernde Coraminwirkung in Urethannarkose läßt sich durch Chloralosezufuhr in eine senkende umkehren, während die blutdrucksteigernde Cardiazolwirkung bestehen bleibt.

5. Der verschiedene Einfluß der Chloralose auf Coramin und Cardiazol besteht auch an der decerebrierten Katze.

6. Zwischen den zentralen Coraminwirkungen und dem Ganglienblocker Pendiomid besteht ein wechselseitig antagonistisches Verhältnis. Die pressorische Wirkung ist leichter blockierbar als die depressorische.

7. Aus der Gesamtheit der Befunde ergibt sich erneut, daß an der depressorischen Komponente der Coraminwirkung ein zentraler Mechanismus wesentlich beteiligt ist.

## Literatur.

Bein, H. J., u. R. Meier: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 273 (1953). — Eliasson, S., B. Folkow, P. Lindgren u. B. Uvnäs: Acta physiol. Scand. (Stockholm) **23**, 333 (1951). — Eliasson, S., P. Lindgren u. B. Uvnäs: Acta physiol. Scand. (Stockh.) **27**, 18 (1952). — van Esveld, L. W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **149**, 348 (1930). — Faust, E.: Schweiz. med. Wschr. **1924**, 229. — Feger, G.: Diss. Hannover 1936. — Gollwitzer-Meier, Kl.: Klin. Wschr. **1936**, 508. — Hahn, F.: 1. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 472 (1941); 2. **198**, 491 (1941); 3. **198**, 509 (1941). — Hahn, F., u. K. Simon: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 563 (1947). — Hahn, F., D. Plester u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 223 (1950). — Hahn, F., u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 325 (1950). — Heim, F., u. H. Wagner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 343 (1953). — Massart, J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **37**, 34 (1930). — Myers, G. N.: J. Hyg. **40**, 474 (1940). — Neil, E., C. R. Redwood and A. Schweitzer: J. of Physiol. **109**, 281 (1949). — Regniers, P., et G. de Vleeschhouwer: Arch. internat. Pharmacodynamie **50**, 65 (1935). — Russu, I. G., u. T. Sparchez: Z. exper. Med. **98**, 772 (1936). — Serin, F.: Acta pharmacol. (Kopenh.) **9**, 59 (1953). — Uhlmann, F.: Z. exper. Med. **43**, 556 (1924). — Zinnitz, F., u. F. v. Bergmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 335 (1936).

Prof. Dr. Fritz Hahn, Düsseldorf, Moorenstr. 5, Pharmakol. Inst. d. Med. Akademie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 130—139 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut (Vorstand: Prof. A. Jarisch) und dem Pharmakognostischen Institut (Vorstand: Prof. O. Schaumann) d. Universität Innsbruck.

# Die Wirkung der Anoxie auf den isolierten Meerschweinchendarm*.

Von

C. Job, O. Schaumann und H. Schmidt.

Mit 6 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 12. März 1955.)*

Die altbekannte Tatsache der postmortalen Darmkontraktionen war wiederholt Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Van Braam-Houckgeest beobachtete bei Atmungsunterbrechung postmortale, bzw. agonale Darmbewegungen, die in einem Experiment, bei dem das Kaninchen durch künstliche Atmung die Erstickung überlebte, rasch wieder verschwanden. Anoxämie schien als Ursache nicht in Frage zu kommen, weil die spontane Darmtätigkeit durch Verbluten oder Aortaabklemmung zum Stillstand kam. Die Steigerung der Motilität fand van Braam nur, wenn, wie das bei der Asphyxie der Fall ist, die Darmgefäße mit cyanotischem Blut gefüllt sind. Besonders ausführlich beschäftigte sich mit dieser Frage Warmoes. Dieser Autor findet, daß eine Kohlensäureüberladung als auslösendes Moment nicht in Frage kommt und daß weder das zentrale Nervensystem noch auch das vegetative Nervensystem von wesentlichem Einfluß sind. Er glaubt, in seinen Versuchen auch Sauerstoffmangel als alleinige Ursache ausschließen zu können und kommt zu dem Schluß, daß die postmortale Peristaltik eine „manifestation d'angoise d'un systeme nerveux local intraintestinal" ist, das er als „metasympathisches" System vom „orthosympathischen" und „parasympathischen" abtrennt. Warmoes unterscheidet bei dieser nach Aufhören der Atmung oder Unterbrechung der Blutzirkulation auftretenden Motorik zwei Phasen: 1. Ein relativ kurz dauerndes Stadium einer sehr lebhaften Peristaltik, 2. eine anschließende Phase einer Kontraktur des Darmes, wobei die lokale Erregbarkeit noch erhalten bleibt. Er weist ferner auch darauf hin, daß bei Untersuchungen an Darmstücken in vitro sich diese meist in der zweiten Phase befinden. Diesen Beobachtungen über eine erregende Wirkung des Sauerstoffmangels stehen solche von Bayliss u. Starling gegenüber, die bei Aortenabklemmung nur Tonusverlust und Aufhören der Spontanaktivität auch beim Kaninchen beobachteten, dessen agonale Darmperistaltik nach allgemeiner Erfahrung regelmäßig eintritt. In einer ausführlichen Untersuchung konnten auch Weltz u. v. Werz sowohl in situ als auch am isolierten Darm nur eine depressive Wirkung des Sauerstoffentzuges beobachten. Bei Wiederzufuhr des Sauerstoffes fanden diese Autoren, wie schon Bayliss u. Starling, eine gesteigerte Motilität, die als „Erholungseffekt" bezeichnet wird.

Im folgenden soll über Beobachtungen berichtet werden, die am *isolierten* Dünndarm des Meerschweinchens über den Einfluß der Sauerstoffversorgung auf die verschiedenen Formen seiner Motorik gemacht wurden.

* Herrn Prof. A. W. Forst zum 65. Geburtstag gewidmet.

## Methodik.

Einem durch Nackenschlag getöteten Meerschweinchen wird ein 5—6 cm langes Stück des oberen Jejunum entnommen und sofort in körperwarme *Fleisch*lösung mit einem $p_H$ von 7,1 gebracht, die reichlich mit einem Gemisch von Sauerstoff und 2 Vol-% Kohlensäure durchperlt wird.

Zur Aufzeichnung der Längs- und Ringmuskelkontraktionen wird ein Ende des Darmstückes (gewöhnlich das stomachale) über einen rechtwinkelig gebogenen dünnen Glasstab gezogen (Abb. 1). In der Mitte dieses waagrecht verlaufenden, etwa 1,5 cm langen Darmteiles wird ein Faden an den arkadenförmigen Gefäßen des Mesenterialansatzes befestigt, der die Ringmuskeltätigkeit auf einen Schreibhebel überträgt. Die Längsmuskelkontraktion liefert das senkrechte, etwa 4 cm lange Darmstück. Eine kleine, in das coecale Ende geschnittene Öffnung verhindert die Sekrethäufung im Darmlumen.

Beide Schreibhebel dürfen nur einen geringen Zug auf den Darm ausüben. Besonders sorgfältig muß der Ringmuskelhebel ausgelastet sein, weil sonst aktive Präparate periodische Ring- und Längsmuskeltätigkeit zeigen, die bei manchen Versuchen stört (Abb. 2).

Bei dieser Registriertechnik ist zu beachten, daß kräftige Ringmuskelkontraktionen des waagrechten Darmstückes, wenn sie den Übergang in den senkrechten Abschnitt (das Knie) miterfassen, auf der Kurve eine Längsmuskelverkürzung vortäuschen. Direkte Beobachtung klärt meist den Sachverhalt.

Durch Dehnung des Ringmuskels im waagrechten Darmabschnitt können Längs- und Ringmuskelkontraktionen ausgelöst werden. Diese Dehnung kann einfach durch kurzes Beklopfen oder durch geeignete Belastung des Ringmuskelhebels erreicht werden. Es kann hierzu auch ein Elektromagnet verwendet werden, der bei Stromschluß den Schreibhebel auf eine bestimmte Zeit immer gleich weit herunterdrückt. Dieses Verfahren empfiehlt sich, wenn die ausgelösten Kontraktionen Änderungen der Erregbarkeit des Präparates quantitativ aufzeigen sollen und der Dehnungsreiz daher gleich stark und gleich lang sein muß.

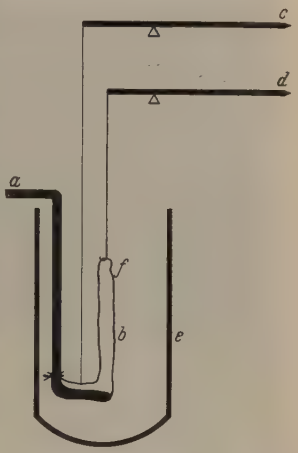



Abb. 1. Situationsskizze der Registriermethode. *a* gebogener Glasstab; *b* teilweise über den Glasstab gezogenes Darmstück; *c* Ringmuskelhebel; *d* Längsmuskelhebel; *e* temperaturkonstantes Darmgefäß; *f* Öffnung in der Darmwand, um Sekretanhäufung zu verhindern.

## Versuchsteil.

Es zeigte sich, daß auf eine geringe und kurzzeitige Dehnung des waagrechten Darmabschnittes nach Bruchteilen einer Sekunde eine Kontraktion der Längsmuskulatur im senkrechten Teil folgt. Ob das stomachale oder cöcale Ende den waagrechten gedehnten Abschnitt bildet, war für das Auftreten dieser Längsmuskelverkürzung nicht wesentlich. Bei stärkerer Dehnung kommt es außerdem im gedehnten Darmteil zu einer Kontraktion der Ringmuskulatur. Durch Nicotin (etwa $10^{-6}$) und Morphin (etwa $2{,}5 \times 10^{-8}$) werden diese Kontraktionen unterdrückt. Sie sind also ebenso wie die Peristaltik nur auslösbar, solange der ganglionäre Anteil des Reflexapparates funktioniert.

Wir haben diesen einfach auslösbaren Dehnungsreflex benützt, um die Erregbarkeit des Darmes bei Sauerstoffmangel zu untersuchen. Wenn statt des Sauerstoff-Kohlensäuregemisches ein Stickstoff-Kohlensäuregemisch durch die Nährlösung geleitet wird, kann man in der Regel zwei durch eine Pause getrennte Erregungsphasen der Darmmotorik beobachten. Als erstes Zeichen des Sauerstoffmangels ist der Dehnungsreflex, wie in Abb. 3 ersichtlich, gesteigert. In diesem Versuch war die Stärke des Dehnungsreizes (D) so gewählt worden, daß eine

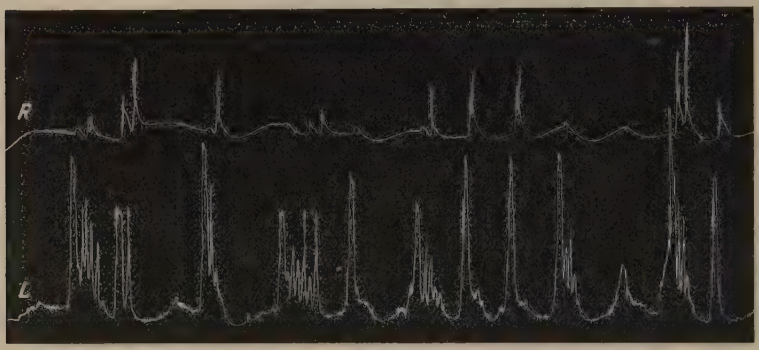



Abb. 2. Oberes Jejunum des Meerschweinchendarmes wie in allen folgenden Versuchen. Spontane Ring- (*R*) und Längs- (*L*) Muskelaktivität bei Belastung des Ringmuskelhebels.

mittelstarke Längsmuskel-, aber noch keine Ringmuskelkontraktion auftrat. Die Steigerung der Erregbarkeit des Präparates durch die Hypoxie ist daran zu erkennen, daß etwa 1 min nach der Stickstoff-Kohlensäurezufuhr auf den gleichen Dehnungsreiz eine wesentlich stärkere Längsmuskelkontraktion folgt, die jetzt auch von einer kräftigen Ringmuskelverkürzung begleitet ist. Daran schließt sich eine Serie rhythmischer und koordinierter Ring- und Längsmuskelkontraktionen, etwa wie bei einer echten Peristaltik in der üblichen Versuchsanordnung nach Trendelenburg.

Nicht alle Präparate reagieren auf Sauerstoffentzug mit dieser ersten Phase gesteigerter Erregbarkeit. So z. B. zeigen Darmstücke, denen der Dehnungsreflex fehlt, auch keine koordinierten Längs- und Ringmuskelkontraktionen bei Sauerstoffmangel. Aber auch bei einem guten Dehnungsreflex wird diese erste Phase des Sauerstoffmangels manchmal vermißt. Entscheidenden Einfluß auf ihr Zustandekommen hat die Geschwindigkeit des Sauerstoffentzuges. Wenn das Stickstoff-Kohlensäuregemisch sehr rasch durch die Nährlösung perlt, erlischt der Dehnungsreflex anscheinend ohne Exzitationsstadium in wenigen Minuten. Desgleichen zeigt sich bei zu langsamer Durchströmung mit dem Stickstoff-Kohlensäuregemisch keine Dehnungsreflexsteigerung oder Spontanaktivität.

Anschließend an diese erste Phase bleibt der Darm, von kleinen Längsmuskelbewegungen abgesehen, meist ruhig. Der Dehnungsreflex

ist in diesem Stadium völlig erloschen und tritt ohne Wiederzufuhr von Sauerstoff nicht mehr auf.

Dauert der Sauerstoffmangel weiter an, so treten neuerlich Kontraktionen der Längs- und Ringmuskulatur auf. Ihr Ablauf ist aber in dieser zweiten Phase des Sauerstoffmangels ein völlig anderer. Es sind relativ

Abb. 3. Sauerstoffmangelversuch. *D* kurze Dehnung der Ringmuskulatur. Der Längsmuskel reagiert darauf mit einer ein- oder zweigipfeligen Kontraktion. Bei $N_2$ Einleitung des Stickstoff-Kohlensäuregemisches. Nach 1 min Steigerung des Dehnungsreflexes und koordinierte Ring- und Längsmuskelkontraktionen (erste hypoxische Erregungsphase). Nach Aufhören dieser Erregungsphase ist der Dehnungsreflex erloschen. Etwa 10 min nach Beginn des Sauerstoffentzuges setzt die zweite hypoxische Erregungsphase (Pendelbewegungen) ein. Nach 15 min dauernder Hypoxie wird wieder Sauerstoff zugeleitet. Dadurch kommt es neuerlich zu koordinierten Ring- und Längsmuskelkontraktionen und außerdem zu einer Tonussteigerung.

rasch aufeinander folgende Verkürzungen der Ring- und Längsmuskulatur vom Typus der Pendelbewegungen ohne sichere Koordination, die schließlich in das Lähmungsstadium völliger Anoxie übergehen. Häufig ist außerdem eine Tonussteigerung besonders der Ringmuskulatur zu beobachten.

Diese zweite Erregungsphase tritt mit großer Regelmäßigkeit auch bei Darmstücken auf, die von Anfang an keinen Dehnungsreflex zeigen. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffentzuges hat hier weniger Bedeutung als bei der ersten Erregungsphase.

Wenn die Hypoxie nicht zu lange dauert, treten, wie Abb. 3 zeigt, bei erneuter Zufuhr des Sauerstoff-Kohlensäuregemisches wieder die koordinierten Längs- und Ringmuskelkontraktionen der ersten Phase und gleichzeitig auch eine Tonuszunahme der Längs- und Ringmusku-

latur sowie der Pendelbewegungen auf. Diese postanoxischen Pendelbewegungen sind, weil sie zeitlich mit den koordinierten Kontraktionen zusammenfallen, gewöhnlich nur bei solchen Präparaten sicher zu erkennen, deren Peristaltik durch Morphin oder Nicotin gelähmt ist.

Durch die Anwendung von Morphin und Nicotin ergab sich ein Weg zur Analyse der hypoxischen und postanoxischen Kontraktionen. Wir fanden, daß beide Gifte den Dehnungsreflex blockieren und ebenso die koordinierten Längs- und Ringmuskelkontraktionen der ersten Phase

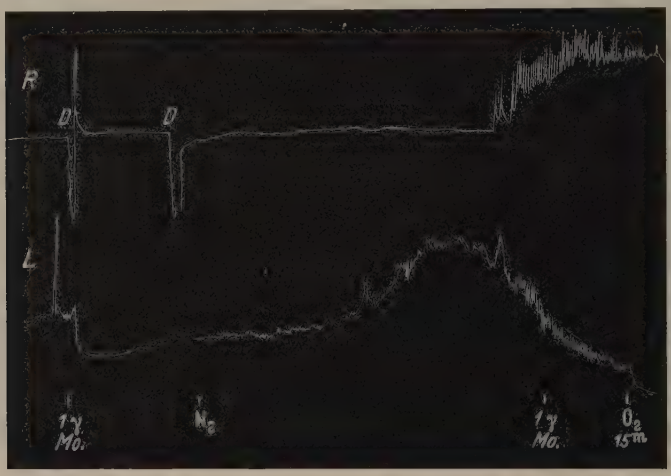



Abb. 4. Aufhebung des Dehnungsreflexes und der ersten hypoxischen Phase durch Morphin. Vor Beginn des Sauerstoffentzuges (*N*) wird 1 $\gamma$ Morphin der Badflüssigkeit zugegeben. (Endkonzentration etwa $2{,}5 \cdot 10^{-8}$.) Es treten nur die Pendelbewegungen der zweiten hypoxischen Phase auf. Sie werden auch durch weitere Zugabe von Morphin nicht beeinflußt.

im hypoxischen und postanoxischen Stadium unterdrücken. Im Gegensatz dazu konnten die hypoxischen und postanoxischen Pendelbewegungen der zweiten Phase durch Morphin und Nicotin *nicht* aufgehoben werden. Im Versuch der Abb. 4 wurde der Dehnungsreflex durch etwa $2{,}5 \times 10^{-8}$ Morphin gelähmt. Auf Zuleitung des Stickstoff-Kohlensäuregemisches blieben die koordinierten Längs- und Ringmuskelkontraktionen aus. Die zweite hypoxische Erregungsphase (die Pendelbewegungen) trat jedoch trotz Morphin auf und wurde auch durch eine weitere Morphingabe nicht unterdrückt. Mit Nicotin (etwa $10^{-6}$) ergab sich derselbe Befund (Abb. 5).

Acetylcholin (etwa $2{,}5 \times 10^{-9}$) löst, wenn es nach Aufhören der hypoxischen Pendelbewegungen dem Bade zugesetzt wird, eine Verkürzung der Längsmuskulatur aus, die rasch in Erschlaffung übergeht (Abb. 5). Eine zweite und eine zehnfach höhere dritte Acetylcholindosis kontrahiert dann nur mehr wenig. Zu diesem Zeitpunkt der Hypoxie

reagiert der Darm demnach auf Acetylcholin ähnlich wie unter normalen Bedingungen auf Nicotin. Erst nach Sauerstoffzufuhr bewirkt das im Gefäß verbliebene Acetylcholin eine starke und anhaltende Kontraktion, die dem gewohnten Wirkungsbilde entspricht.

Prostigmin verstärkte die hypoxischen Pendelbewegungen (Abb. 6). Dieser Versuch wurde am nicotinvergifteten Darm durchgeführt

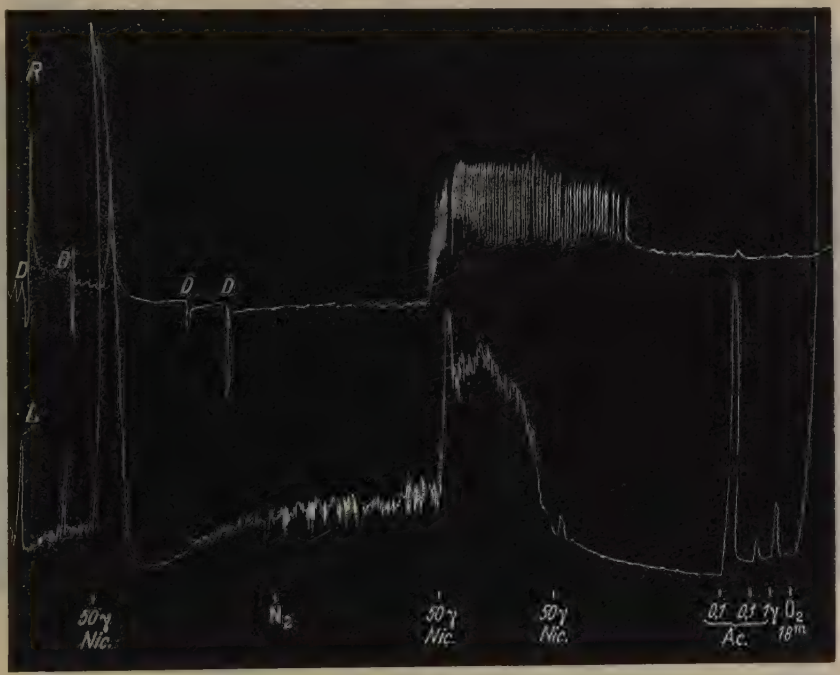



Abb. 5. Aufhebung des Dehnungsreflexes und der Sauerstoffmangelkontraktionen der ersten Phase durch Nicotin. 50 $\gamma$ Nicotin (Endkonzentration im Bad etwa $10^{-6}$) lähmt den Dehnungsreflex und unterdrückt die erste hypoxische Erregungsphase. Auf die Pendelbewegungen hat diese und die folgenden Nicotingaben keinen Einfluß. Nach Aufhören der Pendelbewegungen löst Acetylcholin nur eine kurzdauernde, rasch in Erschlaffung übergehende Kontraktion aus. Die folgenden Acetylcholingaben sind beinahe unwirksam, führen aber nach Wiederzufuhr des Sauerstoffes rasch zu einer anhaltenden Verkürzung des Längsmuskels (Schreibhebel entgleist).

(Kurve *A*), um peristaltische Kontraktionen auszuschalten. Im Vorversuch (Kurve *B*) setzten nach Zuleitung des Stickstoff-Kohlensäuregemisches Pendelbewegungen ein, die schließlich mit zunehmender Hypoxie gelähmt wurden und bei Wiederzufuhr von Sauerstoff erneut auftraten. Nach einer Pause wurde der Sauerstoffentzug unter Prostigminwirkung wiederholt (etwa $2{,}5 \times 10^{-8}$). Wie Kurve *C* zeigt, wurden sowohl die hypoxischen als auch die postanoxischen Pendelbewegungen durch Prostigmin verstärkt.

Atropin wirkt, wie zu erwarten war, umgekehrt wie Prostigmin. Es lähmt die hypoxischen Pendelbewegungen. In der Regel ist die zur Lähmung nötige Dosis auffallend groß (etwa $5 \times 10^{-6}$).

### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Abschwächung bzw. Unterdrückung der auf eine kurze lokalisierte Dehnung des Ringmuskels folgenden Kontraktionen des Längsmuskels und auch des gedehnten Ringmuskelsegmentes durch Morphin

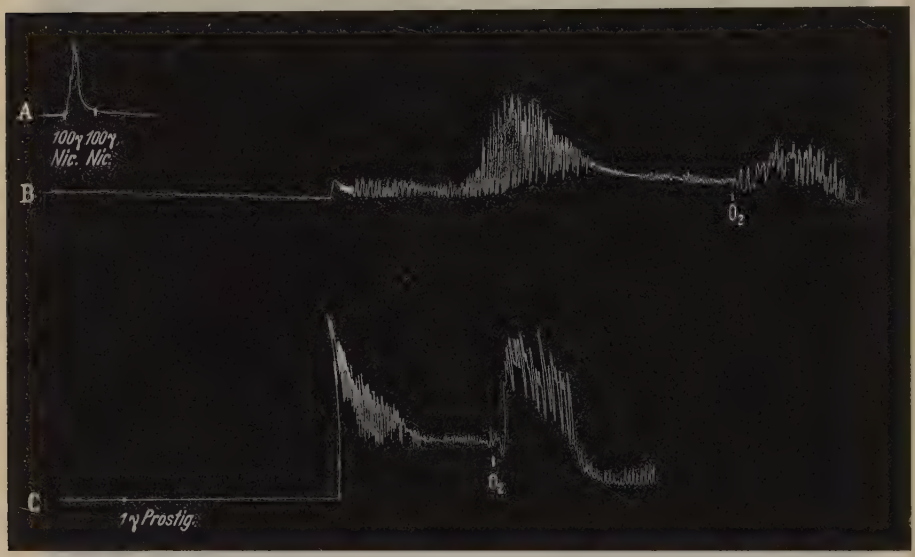



Abb. 6. Verhalten der Ringmuskulatur des nicotinvergifteten Darmes auf Sauerstoffmangel *A* Zugabe von 2mal je 100 $\gamma$ Nicotin zur Badflüssigkeit, anschließend Abschalten der Sauerstoffversorgung; *B* hypoxische und postanoxische Erregung der zweiten Phase; *C* derselbe Versuch etwa 20 min später nach Zugabe von 1 $\gamma$ Prostigmin.

oder Nicotin weist auf einen Reflexbogen mit zwischengeschalteten Synapsen hin. Dieser Reflex ist in der ersten Phase der Anoxie über die Norm gesteigert, während er in der zweiten Phase erloschen ist. Auch dies deutet darauf hin, daß die koordinierte Motilität der ersten Phase durch die Erregung eines intramuralen Reflexapparates zustande kommt. Daß Ganglien in den ersten Stadien einer Hypoxie übererregbar werden, ist eine bekannte Erscheinung (Bargeton sowie Bronk u. Larabee).

Die unkoordinierten Kontraktionen der zweiten Phase lassen sich weder durch Morphin noch durch Nicotin unterdrücken. Dies und die Tatsache, daß in diesem Stadium der fortgeschrittenen Hypoxie auch der Dehnungsreflex verschwunden ist, deutet auf einen postganglionären Ursprung hin. Dieser könnte in einer direkten Erregung einer nicht

durch Ganglien unterbrochenen nervösen Struktur zu suchen sein, analog der von KUGELBERG näher untersuchten hypoxischen Erregung peripherer Nerven.

Eine Prostigmindosis, die für sich allein noch keine Kontraktionen auslöst, verstärkt wesentlich die unkoordinierte Motilität der zweiten Phase, die in diesem Falle gewissermaßen explosionsartig mit der größten Amplitude beginnt, während ohne Prostigmin die Kontraktionen an Höhe und Frequenz allmählich bis zu einem Maximum zunehmen, um dann bei fortschreitender Anoxie abzuklingen. Diese „Sensibilisierung" der Pendelbewegungen durch Prostigmin spricht dafür, daß an dem Kontraktionsmechanismus ein durch die Cholinesterase spaltbarer Stoff, Acetylcholin oder Acetylaneurin, beteiligt ist. Deshalb erscheint es wahrscheinlich, daß der durch die Hypoxie erregte Apparat in dem ganglienfreien Syncytium des BOECKEschen Plexus oder direkt in den neuromuskulären Synapsen zu suchen ist. Für letzteres spricht, daß im Stadium der anoxischen Lähmung der Pendelbewegungen auch die Acetylcholinwirkung schon stark herabgesetzt ist. Eine relativ große Menge Acetylcholin führt nur zu einer einmaligen scharfen Zacke, während folgende Dosen fast unwirksam bleiben.

Solche rasche, kurzdauernde Kontraktionen auf Acetylcholin haben FARAH u. Mitarb. nach Fluoracetat beobachtet. Ob hier mehr als eine äußere Ähnlichkeit vorliegt, müssen erst weitere Versuche zeigen.

In welchem Ausmaße sich daneben auch das Histamin an der Auslösung der hypoxischen Pendelbewegungen beteiligt, läßt sich noch nicht sagen. Daß zumindest ein Teil der hypoxischen Tonussteigerung durch Histamin zustande kommt, ergibt sich aus der deutlichen Gegenwirkung kleiner Antihistamindosen (z. B. Benadryl $3 \cdot 10^{-8}$). Wir verweisen in diesem Zusammenhang auf die Arbeit von FELDBERG u. SMITH, in der die Rolle des Histamins bei der Darmmotorik eingehend besprochen wird und vor allem auf den von HOLTZ geführten Nachweis, daß die Histaminbildung im Darmbrei unter Sauerstoffmangel gesteigert ist.

In unseren Versuchen löst der Sauerstoffmangel am isolierten Darm die gleichen Erscheinungen aus, wie sie VAN BRAAM-HOUCKGEEST und WARMOES am Darm in situ bei Erstickung oder Unterbrechung der Blutzirkulation beobachtet haben.

Der Mechanismus muß daher in der Darmwand selbst liegen. Er läßt sich in zwei Teile gliedern: Einen ganglionären Apparat, der für Erregung und Lähmung empfindlicher ist und zu den langsamen koordinierten Kontraktionen von Längs- und Ringmuskel im Sinne einer Peristaltik führt, und einen zweiten, in beide Richtungen weniger empfindlichen Teil, der zu den frequenten unkoordinierten Bewegungen vom Typus der „Pendelbewegungen" führt. Beide Phasen können am Beginn der Wiederzufuhr von Sauerstoff auftreten. Die erste Phase der koordinierten „Peristaltik" kehrt allerdings nur bei nicht zu lange dauernder Hypoxie wieder, sie ist auch nur an frischen Darmstücken auslösbar. Als primäre Ursache

ist wohl die Hypoxie anzunehmen, da alle anderen Faktoren, vor allem die Kohlensäurespannung praktisch konstant bleiben.

Das Auftreten und die Stärke der Sauerstoffmangelerregung hängt von der Geschwindigkeit ab, mit der das Stickstoff-Kohlensäuregemisch den Sauerstoff aus der Badeflüssigkeit vertreibt. Diesbezüglich entspricht unser in vitro-Befund durchaus einer Beobachtung von Warmoes in situ. Er stoppte den Blutstrom in einer Darmschlinge durch Gefäßligaturen und unterbrach anschließend die Atmung des Kaninchens. Die mit der Zirkulation in Verbindung stehenden Darmschlingen wurden rasch cyanotisch und zeigten gleichzeitig heftige Unruhe. Im abgebundenen Darmstück dagegen traten Bewegungen erst viel später und nur ganz schwach auf; ebenso verhielt es sich hier mit der Cyanose. Infolge der Bedeutung der Geschwindigkeit des Sauerstoffentzuges bei unseren Versuchen in vitro kamen wir zu folgender Erklärung dieser Beobachtung: Bei der Gefäßligatur sinkt der Sauerstoffspiegel im Darm wegen des geringen Verbrauches relativ langsam, wobei dem stagnierten Blut der Sauerstoff allmählich entzogen wird. Bei der Atmungsunterbrechung dagegen strömt durch die Darmgefäße ein von anderen Organen mit höherem Sauerstoffbedarf bald völlig ausgeschöpftes Blut. Der Sauerstoffmangel wird unter diesen Umständen viel rascher eintreten, weil jegliche Blutsauerstoffreserve in den Darmgefäßen fehlt und möglicherweise sogar ein umgekehrtes Gefälle auftritt, wodurch der Gewebssauerstoff in das asphyktische Blut rückdiffundiert.

Die Auslösung von hypoxischen Erregungserscheinungen ist also unverkennbar an einen bestimmten Gradienten des Sauerstoffverlustes gebunden. Daraus ergibt sich mindestens teilweise eine Erklärung dafür, daß von verschiedenen Untersuchern keine hypoxische Erregung, sondern eine scheinbar primäre depressive Wirkung des Sauerstoffmangels gefunden wurde.

Eine definitive Erklärung für das Zustandekommen dieser hypoxischen und postanoxischen Darmerregung steht noch aus. Immerhin sind gewisse Parallelen zu den viel besser bekannten Wirkungen des Sauerstoffmangels am peripheren Nerven unverkennbar.

Bei Sauerstoffentzug zeigen motorische und sensible Nerven ein Stadium gesteigerter Erregbarkeit mit Absinken der Rheobase und Akkomodation. In diesem Zustand bildet eine durch Sauerstoffmangel depolarisierte Nervenstrecke einen aktiven Focus, von dem spontane Erregungen ausgehen. Weiter fortschreitende Hypoxie führt zu Lähmung. Sobald es bei Wiederzufuhr von Sauerstoff zu einer Erholung kommt, kann neuerlich ein Stadium gesteigerter Erregbarkeit und spontaner Aktivität beobachtet werden (Kugelberg).

Unsere Versuche zeigen, daß für die Ergebnisse von Untersuchungen am isolierten Darm — aber auch am Darm in situ — die Sauerstoffversorgung ein maßgeblicher Faktor ist, der bei der Beurteilung solcher Versuchsergebnisse stets berücksichtigt werden muß. Dies gilt vor allem für Versuche am „Magnus-Darm", bei denen der Zustand einer recht weitgehenden Hypoxie mit ihren Folgen meist sogar absichtlich herbeigeführt wird, indem man vor Beginn der Versuche den Darm in der meist nur mit Luft durchperlten Badeflüssigkeit „ruhen" läßt oder von vornherein „abgelagerte" Darmstücke verwendet. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, wie sich nunmehr begründen läßt, daß der Darm

zwar noch seine Reaktionsfähigkeit für zugesetzte Pharmaka besitzt, störende Reflexe aber bereits ausgeschaltet sind.

Auf eine Hypoxie durch verminderte Blutversorgung könnten neben der postmortalen Erregung der Darmmotorik auch noch andere bekannte Tatsachen zurückgeführt werden:

1. Die Koliken der „Angina abdominalis" und der Bleivergiftung. Hier handelt es sich wahrscheinlich um eine Erregung der Darmmotorik bis zum Spasmus (zweite Phase) durch relativen Sauerstoffmangel infolge Durchblutungsstörungen.

2. Für das Vasopressin des Hypophysenhinterlappens konnte bisher am isolierten Darm die am Ganztier stets erzielte Steigerung der Darmmotorik noch nie einwandfrei nachgewiesen werden; auch eigene diesbezügliche Versuche in verschiedenen Versuchsanordnungen blieben erfolglos. Hier wäre am Ganztier eine Verminderung der Darmdurchblutung infolge der bekannten gefäßverengenden Wirkung des Vasopressins am Darm eine verständliche Erklärung.

3. Am isolierten Kaninchendünndarm sind die Pendelbewegungen besonders gut ausgebildet, während in situ der leere Darm fast völlig ruhig steht. Der isolierte Kaninchendarm ist möglicherweise von vornherein in der zweiten Phase der Hypoxie mit ihren frequenten rhythmischen Kontraktionen, da die relativ starke Muskelschicht eine optimale Sauerstoffversorgung durch Diffusion, wie sie beim Meerschweinchendünndarm mit seiner dünnen, unzusammenhängenden Längsmuskelschicht noch möglich ist, verhindert.

## Zusammenfassung.

Es wird eine neue Methode zum Studium der Reflexe am isolierten Dünndarm des Meerschweinchens beschrieben.

Es wird gezeigt, daß Sauerstoffmangel auch am isolierten Darm zu zwei voneinander trennbaren Erregungsphasen führt: Bei der ersten Phase handelt es sich um koordinierte Bewegungen der Längs- und Ringmuskulatur nach Art der Peristaltik. Diese Kontraktionen werden durch Morphin und Nicotin unterdrückt und sind daher ganglionären Ursprunges. Die darauf folgende zweite, durch Morphin und Nicotin nicht hemmbare Phase von „Pendelbewegungen" wird als Erregung einer ganglienfreien nervösen Struktur gedeutet.

Das Auftreten und die Stärke dieser hypoxischen Erregungsphasen ist an eine bestimmte Geschwindigkeit des Sauerstoffentzuges gebunden.

## Literatur.

Bargeton, D.: Amer. J. Physiol. **121**, 261 (1938). — Bayliss, W. M., and E. H. Starling: J. of Physiol. **24**, 99 (1899); **26**, 125 (1901). — Van Braam-Houckgeest: Pflügers Arch. **6**, 266 (1872). — Bronk, D. M., and M. G. Larabee: Amer. J. Physiol. **119**, 279 (1937). — Farah, A., T. C. West and R. Angel: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 234 (1950). — Feldberg, W., and A. N. Smith: J. of Physiol. **124**, 219 (1954). — Holtz, P., K. Credner u. A. Reinhold: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 688 (1939). — Kugelberg, E.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **8**, Suppl. XXIV (1945). — Warmoes, Fr.: Arch. internat. Pharmacodynamie **30**, 113 (1925). — Weltz, G. A., u. R. v. Werz: Luftfahrtmedizin **7**, 98 (1942).

Prof. Dr. O. Schaumann,
Pharmakognostisches Institut der Universität, Innsbruck/Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 140—151 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hauschild).

# Untersuchungen über den Calcium- und den Magnesiumkomplex des äthylendiamintetraessigsauren Natriums.

Von
Günter Dentzer.

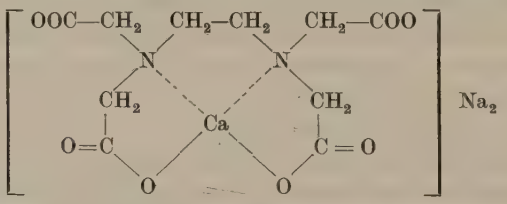
Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 14. März 1955.)*

## Einleitung.

Als typische Zeichen einer intravenösen Calciummedikation sind Hitzegefühl, Parästhesien und Schwindelgefühl bekannt. Neuerdings sind nach Bersin diese unangenehmen Begleiterscheinungen zu vermeiden, wenn komplexgebundenes Calcium in Form des calciumäthylendiamintetraessigsauren Natrium zugeführt wird. Neben Calcium bindet äthylendiamintetraessigsaures Natrium, als „Komplexon III" oder „Trilon B" bekannt, verschiedene andere mehrwertige Ionen wie Magnesium, Strontium, Barium, Eisen, Kobalt.

Die Strukturformel der Komplexverbindung ist folgende:




Diese Fähigkeit zur Komplexbindung benutzte Schwarzenbach zur Entwicklung komplexometrischer Titrationsmethoden. Die Bedingungen der Komplexbildung wurden genauer geprüft und die Komplexkonstanten ermittelt. Mit ihrer Hilfe läßt sich eine „Verdrängungsreihe" aufstellen: Calcium besitzt eine höhere Komplexkonstante als die übrigen im Serum vorhandenen Ionen, z. B. Magnesium (Kalium und Natrium werden nicht komplex gebunden). Auch Zink, Eisen, Kupfer und Kobalt stehen in der „Verdrängungsreihe" unterhalb des Calciums, werden also durch dieses aus ihrer Komplexbindung verdrängt.

Neben Bersin führten amerikanische Autoren schon früher die ersten pharmakologischen Untersuchungen über den Calciumkomplex durch. Nach den Untersuchungen von Bersin am Froschherzen müßte man eine 1%ige Abspaltung von

Calciumionen aus dem Komplex annehmen. Für eine solche Abspaltung scheinen auch Versuche des gleichen Autors über die Beeinflussung der Magnesiumnarkose des Kaninchens zu sprechen, denn er fand nach Calciumkomplex eine typische Weckwirkung.

Hofstetter u. Mayr, Holasek, Geyer u. Flaschka untersuchten die therapeutische Verwendbarkeit von Calciumkomplex und bestimmten den Gehalt des Serums an oxalatfällbarem Calcium, d. h. ionisiertem Calcium nach hohen Dosen Calciumkomplex. Hofstetter fand nach intramuskulärer Injektion von 2 ml einer 50%igen Calciumkomplexlösung nach $1^1/_2$ Std eine durchschnittliche Erhöhung um 1,51 mg-% und nach 7 Std um 0,68 mg-%. Mayr, Flaschka, Holasek u. Geyer, die eine ähnliche Erhöhung des Blutcalciumspiegels fanden, glauben auf Grund komplexchemischer Erwägungen nicht, daß diese Zunahme auf einer Abdissoziation von Calcium aus dem Komplex beruht, erklären sie vielmehr als eine Mobilisation von Calcium aus den Depots.

Schwarzenbach bestimmte die Komplexkonstante für den Calciumkomplex mit $K = 10^{10,6}$. Bersin schließt aus Versuchen am Froschherzen auf eine 1%ige Abdissoziation von Calciumionen aus dem Komplex. Obwohl bei den Froschherzversuchen andere Bedingungen vorlagen als bei der Bestimmung der Konstanten, erscheint diese von Bersin angenommene 1%ige Abdissoziation unwahrscheinlich.

Nach den Arbeiten von McLean u. Hastings sowie Krautwald u. Stuhlmann darf man annehmen, daß Calciumwirkungen am Froschherzen allein durch Calciumionen möglich sind.

Da der Magnesiumkomplex eine wesentlich niedrigere Komplexkonstante als der Calciumkomplex aufweist, wäre nach dessen Applikation offenbar typische Magnesiumwirkung zu erwarten.

Bersin injizierte in einem Versuch einem Kaninchen 102 mg Magnesium/kg subcutan in komplexer Form und beobachtete eine typische Narkose. Diese war allerdings mit $CaCl_2$ subcutan nicht zu durchbrechen.

Es schien erwünscht, erneut zu prüfen, ob der Calciumkomplex fähig ist, die Calciumionen in der Ringer-Lösung zu ersetzen. Um auch eine eventuelle Abspaltung von Calciumionen unter den Verhältnissen in vivo zu berücksichtigen, wurde seine Weckwirkung bei der Magnesiumnarkose geprüft und versucht, den Wirkungsmechanismus des Magnesiumkomplexes zu erklären.

## Experimenteller Teil.

### *I. Versuche mit dem Calciumkomplex.*

1. *Untersuchungen am Froschherzen.* Die Versuche wurden in der Straubschen Anordnung in den Monaten August—November an männlichen und weiblichen Esculenten im Gewicht von 30—50 g durchgeführt. Es wurden Ringer-Lösungen mit 0,02 und 0,01% KCl verwandt. Der Gehalt an den übrigen Salzen war NaCl 0,65%, $CaCl_2$ 0,02% und $NaHCO_3$ 0,01%. Außerdem wurde Ringer-Lösung ohne $CaCl_2$ benutzt.

Wir untersuchten zunächst die Wirkung des Komplexbildners auf die Herzfunktion. Infolge der komplexen Bindung von Calcium war eine

ähnliche Wirkung, wie sie für das Oxalat bekannt ist, zu erwarten. In der Tat führte der Komplexbildner zu Amplitudenverkleinerung (0,335 mg) bzw. Herzstillstand (0,67 mg). Dieser Herzstillstand konnte durch äquimolare Mengen von $CaCl_2$ aufgehoben werden.

Die Untersuchungen des Calciumkomplexes ergaben, daß dieser nicht in der Lage ist, $CaCl_2$ in der normalen Ringer-Lösung zu ersetzen. Nach Zusatz calciumfreier Ringer-Lösung kam es ebenso wie nach Ringer-Lösung, in der das $CaCl_2$ durch äquimolare Mengen von Calciumkomplex ersetzt war, schnell zum Abfall der Amplitude. Das Ausmaß der Schädigung war praktisch nicht von dem calciumfreier Ringer-Lösung zu unterscheiden.

Nach Rothlin wird die Empfindlichkeit des Froschherzens gegenüber Adrenalin durch Calcium-Ionenmangel zunächst gesteigert, schließlich abgeschwächt und bei vollkommenem Calciumentzug aufgehoben.

Wir reduzierten den $CaCl_2$-Gehalt auf $^1/_{100}$ der normalen Menge, d. h. auf 0,2 mg-%, und konnten noch einen deutlichen, wenn auch abgeschwächten Adrenalineffekt (0,5$\gamma$) beobachten. Nach Zugabe von calciumfreiem Ringer (KCl 0,02%) reagierte das Herz auf Adrenalin nicht mehr. Auch in Ringer-Lösung (KCl 0,02%), in der das $CaCl_2$ durch äquimolare Mengen von Calciumkomplex ersetzt war, blieb die Ansprechbarkeit gegenüber Adrenalin aufgehoben (siehe Tab. 1).

*Tabelle 1.*

| $CaCl_2$ Konz. im Ringer mg-% | $Ca^{++}$-Konz. mg-% | Adrenalingabe $\gamma$ | Reaktion |
|---|---|---|---|
| 20 | 7,2 | 0,5 | + |
| 10 | 3,6 | 0,5 | ++ |
| 5 | 1,8 | 0,5 | ++ |
| 2 | 0,72 | 0,5 | ++ |
| 0,2 | 0,072 | 0,5 | + |

| Ca-Komplex. Konzentration im $CaCl_2$-freiem Ringer mg-% | Ca-Gehalt im Komplex mg-% | Adrenalingabe $\gamma$ | Reaktion |
|---|---|---|---|
| 67,5 | 7,2 | 0,5 | — |
| 134,8 | 14,4 | 0,5 | — |

Nach diesen Befunden darf man annehmen, daß wesentlich weniger als 1% des im Komplex gebundenen Calcium als Ion abdissoziiert.

2. *Versuche über die Wirkung von Calciumkomplex auf die Magnesiumnarkose der Maus.* Wir gaben 1,02 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$/kg Maus als 8,5%ige Lösung intraperitoneal und erreichten damit eine typische Narkose. Die $CaCl_2$- bzw. Calciumkomplexlösung wurde spätestens 20 min nach der Verabreichung des Magnesiumsulfat und eingetretener Mg-Lähmung intravenös injiziert. Durch 18 mg Calcium/kg, als 1%ige $CaCl_2$-Lösung

appliziert, war in jedem Falle eine Weckwirkung zu erzielen. Die Tiere erwachten bereits unter der Injektion. Nach der intravenösen Injektion von Calciumkomplex jedoch sahen wir in keinem Fall diesen typischen Weckeffekt, selbst dann nicht, wenn die Calciumlösung das 2-, 4- und 8fache *der* Calciummenge enthielt, welche als $CaCl_2$ die bekannte Weckwirkung zeigte.

In der Tab. 2 sind die Versuchsergebnisse zusammengestellt:

Tabelle 2. *Dauer der Magnesiumnarkose.* (1,02 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$/kg i. p., Maus.)

| | Unbehandelt | Nach 20 min intravenöse Injektion von: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 36 mg Ca/kg als Komplex | 75 mg Ca/kg als Komplex | 150 mg Ca/kg als Komplex | 18 mg Ca/kg als $CaCl_2$ |
| Tierzahl . . . . . | 17 | 15 | 12 | 12 | 12 |
| Dauer der Narkose im Mittel . . . | 64 min | 76 min | 68 min | 69 min | Tiere erwachten während d. Inj. |
| durchschnittliche Abweichung der Dauer . . . . . | ± 26,4 min | ± 25 min | ± 14 min | ± 21 min | — |
| Exitus . . . . . | 2 | 3 | 2 | 2 | 0 |

## *II. Versuche mit dem Magnesiumkomplex.*

1. *Toxicität.* Die Toxicität von Mg-Komplex wurde an Mäusen beiderlei Geschlechts im Gewicht von 15—25 g bestimmt und mit der des Komplexbildners verglichen. Für die subcutane Injektion wurden m/5-Lösungen, für die intraperitoneale m/20-Lösungen und für die intravenöse m/60-Lösungen verwandt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt und jeweils die Dosen, bei welchen 0 von 5 Tieren (= 0/5) und 5 von 5 Tieren (= 5/0) reagierten, angegeben.

*Tabelle 3.*

| Applikationsart | Ergebnis | Mg-Komplex g/kg | Komplexbildner g/kg |
|---|---|---|---|
| subcutan . . . . | 0/5 | 0,23 | 0,27 |
| | 5/0 | 0,65 | 0,55 |
| | LD 50: | 0,38 | 0,42 |
| intraperitoneal . . | 0/5 | 0,24 | 0,24 |
| | 5/0 | 0,40 | 0,38 |
| | LD 50: | 0,32 | 0,32 |
| intravenös . . . . | 0/5 | 0,03 | 0,02 |
| | 5/0 | 0,05 | 0,04 |
| | LD 50: | 0,04 | 0,03 |

Die Vergiftungserscheinungen nach Magnesiumkomplex und Komplexbildner waren völlig gleich.

Die Tiere bekamen nach einem kurzen Stadium starker Dyspnoe und Seitenlage Krämpfe, Schnappatmung und starben. Die mittleren Zeiten bis zum Exitus

betrugen bei subcutaner Applikation des Komplexbildners 14,5 min, von Magnesiumkomplex 11,5 min, unterscheiden sich also praktisch nicht.

2. *Versuche am Froschherzen.* Die Versuche wurden in der Straubschen Anordnung im Herbst 1954 durchgeführt. Es wurden männliche und weibliche Esculenten im Gewicht von 30—50 g benutzt. Die Ringer-Lösung enthielt 0,02% KCl, im übrigen hatte sie die auf Seite 141 angegebene Zusammensetzung.

Zunächst wurde die Wirkung des Magnesiumkomplexes mit der äquimolarer Mengen von $MgS_2O_3$ verglichen. Während Zugabe von 0,135 mg $MgS_2O_3$ als m/50-Lösung die normale Herzfunktion kaum beeinflußte, führte die äquimolare Dosis von Magnesiumkomplex (0,356 mg) zu einer starken Schädigung. Dieser toxische Effekt, aber auch die Schädigung durch die 5fache Menge (1,78 mg Magnesiumkomplex) konnten regelmäßig durch Zugaben äquimolarer Menge $CaCl_2$ beseitigt werden.

Eine Erhöhung des Kaliumgehaltes (K:Ca = 7:2) schädigt das isolierte Froschherz bis zum Herzstillstand. Er kann durch Magnesiumionen in geeigneter Konzentration aufgehoben werden. Diese Ersatzfunktion des Magnesiums wurde als Test benutzt, um eine eventuelle Abgabe von Magnesiumionen aus dem Komplex nachzuweisen.

Zunächst wurde in Vorversuchen die günstigste Konzentration von $Mg\,S_2O_3$ ermittelt, dies war mit 0,135 oder 0,27 mg $MgS_2O_3$ als m/50-Lösung der Fall. Es wurde eine schnelle Restitution erreicht.

Falls aus dem Komplex Magnesiumionen abgegeben werden, müßte sich dies durch eine zumindest geringe Verbesserung der Herztätigkeit erkennen lassen, sie war aber in keinem Fall auch nur angedeutet festzustellen.

3. *Versuche am Phrenicus-Zwerchfellpräparat.* Magnesiumionen erzeugen an der motorischen Endplatte eine curareartige Wirkung. Wir verglichen die Wirkung äquimolarer Mengen von Magnesiumsulfat und Magnesiumkomplex auf die indirekte Erregbarkeit des Nervmuskelpräparates.

Verwendet wurde das Phrenicus-Zwerchfellpräparat nach der von Bülbring angegebenen Methode. Die elektrische Reizung erfolgte mittels rhythmischer Kondensatorentladungen (8—10 Reize/min). Es wurde die von A. Aebi u. L. Aebi angegebene Elektrode verwendet und indirekt gereizt. Das Versuchsgefäß enthielt 60 ml Tyrodelösung; die auf einer Temperatur von 35° gehalten wurde. Die Tyrodelösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| NaCl | 0,8 % | $NaHCO_3$ | 0,1 % |
| KCl | 0,02 % | $NaH_2PO_4$ | 0,005 % |
| $CaCl_2$ | 0,02 % | Glucose | 0,2 % |
| $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$ | 0,00125 % | | |

Die Ausgangskonzentration der Magnesiumionen in der Tyrodelösung betrug 0,15 mg-%. Wurde sie durch Zugabe von $MgSO_4$ auf 16 mg-% erhöht (8 mg-% ließen die Erregbarkeit unbeeinflußt), so war bei gleicher

Reizstromstärke ein 25%iger Abfall der Muskelkontraktionen festzustellen. Wurde dagegen die äquimolare Menge von Magnesiumkomplex (143 mg) hinzugegeben, so war die indirekte Reizbarkeit vollkommen aufgehoben. In diesem Stadium wurde durch äquimolare Mengen von $CaCl_2$ (44 mg) die Erregbarkeit wieder hergestellt, die Muskelkontraktionen stiegen bis zu etwa 75% des Ausgangswertes an (siehe Abb. 1).

Zusatz von $CaCl_2$ (44 mg) kurz vor dem der äquimolaren Menge von Magnesiumkomplex (143 mg) führte nur zu einem 25%igen Abfall der Muskelkontraktionen, wie er auch bei dem durch $MgSO_4$ auf 16 m-g%

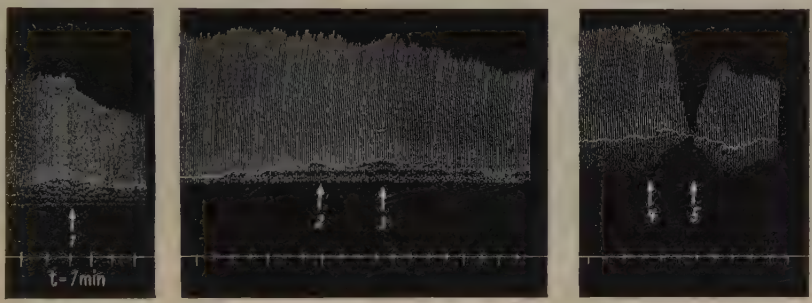



Abb. 1. *Versuche am Phrenicus-Zwerchfellpräparat der Ratte* (indirekte Reizung). Auf ein Bad von 60 ml wurden gegeben: 1. 101 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 2. 44 mg $CaCl_2$, 3. 143 mg Mg-Komplex, 4. 143 mg Mg-Komplex, 5. 44 mg $CaCl_2$.

erhöhten Magnesiumgehalt der Tyrodelösung erhalten wurde. Es konnte also die starke Wirkung des Magnesiumkomplexes auf die indirekte Erregbarkeit des Phrenicus-Zwerchfellpräparates durch Zugabe von $CaCl_2$ auf die Eigenwirkung des Magnesiums reduziert werden.

125 mg Komplexbildner führten ebenfalls zu einer vollständigen Aufhebung der indirekten Erregbarkeit. Nach Zugabe von äquimolarem $CaCl_2$ (44 mg) kam es aber nicht nur zu einer partiellen Wiederherstellung der Erregbarkeit, vielmehr stiegen die Muskelkontraktionen zu ihrem Ausgangsniveau an. Auch halbe Dosen, also 67 mg Komplexbildner und 71,5 mg Mg-Komplex, führten zu einer vollkommenen Aufhebung der indirekten Reizbarkeit. Zugabe äquimolarer Mengen von $CaCl_2$ führte jedoch in beiden Fällen zu einem Wiederanstieg der Muskelkontraktionen auf das Ausgangsniveau.

Dieses Verhalten erklärt sich wie folgt:

Die Ausgangskonzentration von Calciumionen in der Tyrodelösung betrug 7,18 mg-%. Im Bad (60 ml) befinden sich also 4,3 mg Calciumionen. Sowohl 134 mg Komplexbildner als auch 143 mg Magnesiumkomplex vermögen 16 mg Ca-Ionen, also fast 4mal mehr als in der Badeflüssigkeit vorhanden, komplex zu binden. Wenn nach 71,5 mg Magnesiumkomplex und anschließend $CaCl_2$ keine Eigenwirkung der aus dem Komplex freiwerdenden Magnesiumionen feststellbar war, so liegt das daran, daß die Endverdünnung lediglich 8 mg-% Mg-Ionen beträgt, und diese zu keiner Beeinflussung der Muskelkontraktionen führt.

Es wurde versucht, durch Vorgabe von Calciumkomplex ähnlich wie durch $CaCl_2$ die starke Wirkung des Magnesiumkomplexes zu unterdrücken. 149 mg Calciumkomplex wurden zum Bad gegeben und eine Änderung der Erregbarkeit nicht festgestellt. Nach 10 min wurde die äquimolare Menge Magnesiumkomplex (143 mg) zugegeben. Eine Beeinflussung bzw. eine „Schutzwirkung" des Calciumkomplexes war nicht zu erkennen; auch jetzt wurde die indirekte Erregbarkeit vollkommen blockiert. Nochmalige Zufuhr von Calciumkomplex (149 mg) beseitigten die Blockade ebensowenig, wohl aber $CaCl_2$.

4. *Untersuchungen am Blutdruck der Katze.* Die Versuche wurden an Katzen in Chloralose (5%ig)-Urethan (20%ig)-Narkose durchgeführt (2 ml/kg i.m.). Der Blutdruck wurde mittels Hg-Manometer (Carotis) registriert. Es wurde künstlich beatmet.

Bekanntlich führen $MgSO_4$ sowie $MgS_2O_3$ intravenös injiziert zu einem Blutdruckabfall. Wir verglichen die Wirkung von $MgS_2O_3$ und Magnesiumkomplex in äquimolarer Dosis (es wurde „Magnesium Nordmark" mit einem Magnesiumgehalt von 1,8% verwendet). Die Substanzen wurden als 0,4 molare Lösung injiziert.

Während 7,2 mg $MgS_2O_3$/kg nur zu einer geringen Blutdrucksenkung führte, kam es nach Gabe von 20 mg Magnesiumkomplex/kg zu einem Abfall um 25% (Ausgangswert 100 mm Hg), der etwa dem einer Dosis von 19,2 mg $MgS_2O_3$/kg entsprach. Die gleiche Magnesiumdosis als Magnesiumkomplex (51 mg/kg) senkte den Blutdruck um 75—80% der Norm bei gleichem Ausgangswert. Wurde sofort $CaCl_2$, z. B. 21 mg/kg, gegeben, so stieg der Blutdruck schnell über das Ausgangsniveau an. Wurde wiederum Magnesiumkomplex gegeben, resultierte die gleiche Blutdrucksenkung, sie konnte durch $CaCl_2$ prompt beseitigt werden (siehe Abb. 2).

Vergleichsversuche ergaben, daß 42—51 mg Magnesiumkomplex/kg ohne anschließende $CaCl_2$-Gabe zum Herzstillstand führten. 48 mg Komplexbildner/kg senkten den Blutdruck von 85 mm auf 45 mm Hg, also um rund 45%. Die anschließende Injektion von 19,2 mg $MgS_2O_3$/kg verstärkte den Blutdruckabfall. Werle stellte fest, daß die durch $MgS_2O_3$ bedingte Blutdrucksenkung nicht atropinisierbar ist. Wir konnten diesen Befund bestätigen und ermitteln, daß auch die stark depressorische Wirkung von Magnesiumkomplex durch Atropin nicht beeinflußt wird.

5. *Weitere Untersuchungen.* In den folgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob durch Magnesiumkomplex eine Magnesiumnarkose erzeugt werden kann.

a) *Versuche an der Maus.* Wir gaben zunächst Dosen von Magnesiumkomplex (1,49 g/kg), deren Magnesiumgehalt den wirksamen Dosen von $MgSO_4$ entsprach. 1—2 min nach der intraperitonealen Injektion zeigten die Tiere zunächst fibrilläre, teils krampfartige Zuckungen, dann klo-

nisch-tonische Krämpfe der Extremitäten; unter zunehmender Atemnot und Opisthotonus kamen sie ad exitum.

Wurde $^1/_5$ dieser Dosis (= 0,298 g/kg) appliziert, starben von 13 Tieren 7 unter den gleichen Erscheinungen. Die überlebenden Tiere zeigten 5—8 min nach der Injektion krampfartig beschleunigte Atmung, fibrilläre Zuckungen und vorüber-

Abb. 2. *Blutdruckversuch an der Katze* (Gewicht: 1,45 kg, Chloralose-Urethannarkose). Es wurden 0,4 molare Lösungen i.v. injiziert. 1. 19 mg $MgS_2O_3$/kg, 2. 20 mg Mg-Komplex/kg, 3. 51 mg Mg-Komplex/kg, 4. 21 mg $CaCl_2$/kg, 5. 19 mg $MgS_2O_3$/kg, 6. 20 mg Mg-Komplex/kg, 7. 30 mg Mg-Komplex/kg.

gehend Seitenlage, die im Mittel 8 min anhielt. Auch durch den Komplexbildner in subletalen Dosen oder vor Eintritt der Krämpfe war diese Seitenlage vorübergehend festzustellen.

10 weitere Tiere erhielten die gleiche Menge von Magnesiumkomplex (0,298 g/kg) intraperitoneal. Sofort nach Eintritt der Seitenlage wurde diesen 50 mg $CaCl_2$/kg als 1%ige Lösung intravenös injiziert. Die Tiere standen unter der Spritze auf und überlebten alle.

Weder nach subcutaner, intraperitonealer oder intravenöser Zufuhr von Magnesiumkomplex konnten wir eine typische Magnesiumnarkose beobachten. Sowohl die fibrillären Zuckungen, die Krampfatmung, als auch die Ähnlichkeit des Vergiftungsbildes mit dem des Komplexbildners erklären die nach intraperitonealer und subcutaner Applikation auftretende kurze Seitenlage als Calciummangelerscheinung. Im Vordergrund der Vergiftung durch Magnesiumkomplex standen immer hypocalcämisch-tetanische Erscheinungen.

b) *Kaninchenversuche.* In Anlehnung an Bersin erhielten 2 Kaninchen 102 mg Mg/kg in komplexer Form subcutan injiziert. Während Bersin eine typische Narkose beobachtete, die mit 3 ml 50%iger Lösung von „Calcium Hausmann" und anschließender Injektion von 3 ml 5%iger $CaCl_2$-Lösung (0,3 g Ca/kg) subcutan nicht zu durchbrechen war, konnten wir keine typische Narkose beobachten.

Etwa 20 min nach der Injektion trat zwar Seitenlage, jedoch mit Krampfatmung und fibrillären Zuckungen ein. Wenige Minuten später

wurde die Atmung so schlecht, daß wir uns gezwungen sahen, $CaCl_2$ (200 mg als 2%ige Lösung) zu spritzen. Unter der Spritze besserte sich der Zustand der Tiere und kurze Zeit darauf verhielten sie sich vollkommen normal. Wurde kein $CaCl_2$ verabreicht, kamen die Tiere unter Krampfatmung und Krämpfen ad exitum.

Ähnlich den Versuchen an der Maus erklärte sich also die Seitenlage nach Magnesiumkomplex nicht als Mg-Ionenwirkung, vielmehr als Folge des Calciumentzuges.

Einzelheiten sind aus den Protokollen zweier typischer Fälle zu ersehen:

1. Gewicht 2,8 kg
15,10 1,52 g/kg Mg-Komplex s.c. als 0,416 mol. Lösung
15,17 angedt. klon. Krämpfe an hinteren Extremitäten
15,19 Seitenlage
15,21 Atmung unregelmäßig, Krampfatmung
15,23 drohender Atemstillstand
15,24 10 ml 2%ige $CaCl_2$-Lösung i.v., Tier richtet sich auf
15,26 Tier normal
15,45 Tier normal

Am nächsten Morgen 8,00 in Krampfhaltung, tot.

2. Gewicht 3,0 kg
15,40 1,52 g/kg Mg-Komplex s.c. in 0,416 mol. Lösung
16,01 Seitenlage, fibrill. Zuckung
16,04 Krampfatmung
16,05 droh. Atemstillstand
16,06 10 ml 2%ige $CaCl_2$-Lösung i.v. Tier richtet sich auf
16,12 3 ml 10%ige $CaCl_2$-Lösung i.v.
16,14 Tier vollkommen munter
16,20 Tier verhält sich normal
17,30 Tier vollk. erschlafft, unregelm. u. sehr oberflächliche Atmung
17,31 3 ml 10%ige $CaCl_2$-Lösung i.v., unter Injektion vollk. munter
17,40 Kopf sinkt ab
17,45 2 ml 10%ige $CaCl_2$-Lösung, Tier richtet sich wieder auf
17,58 Kopf sinkt wieder ab
18,00 3 ml 10%ige $CaCl_2$-Lösung, Tier erhebt sich und verhält sich normal

Am nächsten Morgen 8,00 Tier tot.

Es wurde regelmäßig festgestellt, daß sich die Tiere nach intravenöser Injektion von $CaCl_2$ erholten und sich über längere Zeit vollkommen normal verhielten, jedoch trotz zum Teil mehrmaliger intravenöser Calciumchloridinjektionen nicht überlebten.

Diese Befunde sprechen gegen eine typische Magnesium-Ionenwirkung des Magnesiumkomplexes, sie lassen sich folgendermaßen erklären:

Den Tieren wurde 1,52 g Magnesiumkomplex/kg subcutan injiziert. Diese können maximal pro kg 102 mg Mg-Ionen abgeben und dafür 170 mg Ca-Ionen binden, deren Entzug also eine starke Hypocalcämie zur Folge haben muß. Durch die intravenöse $CaCl_2$-Injektion wurden dem ersten Tier nur 26 mg Ca-Ionen/kg zugeführt. Im zweiten Versuch entsprach die applizierte $CaCl_2$-Menge nicht ganz dem theoretischen Wert.

In weiteren Versuchen wurde, um Schwankungen hinsichtlich der Resorption zu vermeiden, Magnesiumkomplex intravenös gegeben.

4 Kaninchen erhielten 75,2 mg/kg Magnesiumkomplex als m/10-Lösung innerhalb von 5 min intravenös. Bereits während oder kurz nach der Injektion traten unregelmäßige Atmung und Krämpfe der vorderen und hinteren Extremitäten auf. Unter Krampfatmung kamen die Tiere im Mittel 1,5 min post injektionem ad exitum. 1 Tier erholte sich und überlebte.

2 weiteren Tieren wurde die gleiche Menge Magnesiumkomplex (75,2 mg/kg) und sofort anschließend 24 mg/kg $CaCl_2$, ebenfalls als m/10-Lösung, intravenös injiziert. Die Tiere zeigten kaum Vergiftungserscheinungen und überlebten.

Schließlich erhielten 2 Tiere 75,2 mg/kg Magnesiumkomplex und äquimolar $CaCl_2$ (24 mg/kg) als Mischspritze intravenös injiziert. Die Tiere blieben völlig unbeeinflußt. Durch intravenöse Gabe von 25 mg Mg-Ionen/kg kann man am Kaninchen eine typische Narkose hervorrufen. Werden 75,2 mg Magnesiumkomplex/kg und gleichzeitig $CaCl_2$ in äquimolarer Menge injiziert, können maximal 5 mg Mg-Ionen frei werden, sofern das gesamte applizierte Calcium komplex gebunden wird.

Es ergibt sich daraus, daß die Menge des maximal freigesetzten Mg-Ion nicht ausreichen kann, um eine Magnesiumnarkose hervorzurufen. Wohl aber müßten bei gleichzeitiger Zufuhr der 5fachen Menge von Magnesiumkomplex (375 mg/kg) und äquimolarer Mengen $CaCl_2$ im günstigen Fall 25 mg Mg-Ionen/kg freigesetzt werden, und falls diese schnell erfolgt, eine typische Magnesiumnarkose erzeugen können.

Wir führten derartige Versuche durch. Erhielten z. B. Kaninchen in die Vene des einen Ohres 375 mg Magnesiumkomplex/kg, in die Vene des anderen Ohres äquimolare $CaCl_2$-Mengen (120 mg/kg) als m/5-Lösungen gleichzeitig injiziert, waren sie am Ende der Injektion, also der 5fachen tödlichen Menge, in Seitenlage, reagierten jedoch auf akustische Reize deutlich. Der Cornealreflex war erhalten. Wurden wenige Minuten später 16 mg Mg-Ionen/kg als $MgS_2O_3$ injiziert, verschwand der Cornealreflex und die Tiere kamen in Vollnarkose. Erhielten sie 48 mg $CaCl_2$/kg in 2%iger Lösung intravenös, erwachten sie prompt.

### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Befunde am isolierten Froschherzen zeigen, daß calciumäthylendiamintetraessigsaures Natrium nicht in der Lage ist, Ca-Ionen zu ersetzen und daß der Dissoziationsgrad des Calcium im Komplex weit unter 1% liegen muß. Ferner fanden wir unsere Annahme bestätigt, daß unter den unseren Versuchen zugrunde liegenden Verhältnissen Ca-Ionen nicht in nennenswerter Menge aus der Komplexbindung in wirksamer Form abgegeben werden.

Nach Mayr, Holasek, Geyer und Flaschka sind schon $5^1/_2$ Std nach Injektion von 300 g Calcium in komplexer Form 83% unverändert im Harn ausgeschieden. Der Blutcalciumspiegel dagegen war noch deutlich erhöht. Auffällig war nach diesen Autoren eine periodische Schwankung des Blutcalciumspiegels, die sich vor allem bei Katatonen und Epileptikern nachweisen ließ.

Unsere Untersuchungen und die oben zitierten Befunde sprechen dafür, daß ein Anstieg des Blutcalciumspiegels nach Calciumkomplex

nicht durch Abdissoziation von Ca-Ionen aus dem Komplex bedingt sein kann.

Die Versuche mit magnesiumäthylendiamintetraessigsaurem Natrium am Froschherzen, am Phrenicus-Zwerchfellpräparat der Ratte, am Blutdruck der Katze und am Ganztier zeigen, daß sich die Wirkung des Magnesiumkomplexes, wie auf Grund seiner Komplexkonstanten zu erwarten war, als eine Verdrängung des komplexgebundenen Magnesiums durch das Blutcalcium erklären läßt. Hierdurch werden Magnesiumionen frei und Calciumionen komplex gebunden.

Der normale Blutmagnesiumspiegel beträgt beim Kaninchen 1—2 mg-%, beim Menschen 3—5 mg-%. Nach Cloetta, Fischer und van der Loeff treten beim Kaninchen die ersten Lähmungserscheinungen bei einem Blutmagnesiumspiegel von etwa 10 mg-% auf. Erst bei 20 mg-% kommt es zur vollkommenen Lähmung. Gegenüber Calciumentzug dagegen ist der Organismus äußerst empfindlich, bereits eine Erniedrigung des Blutcalciumspiegels um wenige Milligramm-Prozent führt zur hypocalcämischen Tetanie und schließlich zum Tode.

Hieraus ergibt sich, daß der Calciumentzug im Vordergrund der Vergiftung durch Magnesiumkomplex steht. Ein Magnesiumeffekt ist nur dann zu erzielen, wenn man gleichzeitig ein Vielfaches der tödlichen Dosis von Magnesiumkomplex und äquimolare Mengen Calciumionen zuführt, den durch komplexe Bindung entstehenden Calciumbedarf also sofort abdeckt.

Bersin meint, daß Toxicität und Vergiftungsbild des Magnesiumkomplexes etwa dem von $MgSO_4$ entsprechen. Nach unseren Befunden aber ist der Magnesiumkomplex wesentlich toxischer und das Vergiftungsbild durch Calciumentzug bestimmt.

Neuerdings berichten Hunzinger u. Ortelli über die Calciumausscheidung nach Calciumkomplex beim Menschen. Sie führten mit markiertem Calcium versehenen Calciumkomplex zu und bestimmten über 24 Std die Ausscheidung von Komplexbildnern, $^{45}Ca$ und Gesamtcalcium. Nach ihren Befunden werden vom Komplexbildner (nahezu 100%ige Ausscheidung) 70% als Ca-Komplex, der Rest als Komplexsalz anderer zweiwertiger Kationen ausgeschieden.

30% des im Komplex zugeführten Calciums sollen also gegen andere Ionen ausgetauscht und im Körper retiniert werden. Dieser Austausch müßte nach unseren Versuchen so erfolgen, daß es im akuten Versuch zu keiner nennenswerten Calcium-Ionenwirkung kommt. Weiterhin müßte es ähnlich unseren Befunden mit Magnesiumkomplex, bei denen nicht die freiwerdenden Magnesiumionen, vielmehr der Calciumentzug das Vergiftungsbild bestimmen, durch chronische Calciumkomplexapplikation zu Entzugserscheinungen für andere Ionen, z. B. Mg-Ionen, Fe-Ionen usw. kommen. Zweckmäßig erscheint uns eine solche Therapie bei Vergiftungen, z. B. Blei, wo es mit Hilfe des Austauschprozesses am Komplex möglich ist, das schädliche Agens zu eliminieren, nicht jedoch, wenn es gilt, bei möglichster Schonung des Ionenhaushaltes Calciumionen zuzuführen.

## Zusammenfassung.

1. In Versuchen am Froschherzen konnte gezeigt werden, daß der Calciumkomplex nicht in der Lage ist, $CaCl_2$ in der Ringer-Lösung zu

ersetzen und daß der Prozentsatz der aus dem Komplex freiwerdenden Ca-Ionen unter 1% liegen muß.

2. Durch intravenöse Calciumkomplexgabe konnte die Magnesiumnarkose der Maus weder durchbrochen noch die Dauer beeinflußt werden.

3. Versuche am isolierten Froschherzen, am Phrenicus-Zwerchfellpräparat der Ratte, am Blutdruck der Katze und am Ganztier ergaben, daß die Wirkung des Magnesiumkomplexes auf einer komplexen Bindung der Ca-Ionen im Körper und einer Abgabe von Mg-Ionen aus dem Komplex beruhen dürfte.

Da der Organismus auf Ca-Ionenentzug wesentlich empfindlicher reagiert als auf Mg-Ionenzufuhr, stehen beim Magnesiumkomplex Ca-Ionenentzugserscheinungen im Vordergrund des Vergiftungsbildes.

## Literatur.

Aebi, H., L. Aebi u. A. v. Muralt: Helvet. physiol. Acta **10**, 305 (1952). — Bersin, Th.: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 608. — Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Cloetta, M., H. Fischer u. M. R. van der Loeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 6 (1942/43). — Flaschka, H., u. Z. Huditz: Z. analyt. Chem. **137**, 104 (1952/53). — Foreman, H.: J. of Biol. Chem. **203**, 1045 (1953). — Gaede, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 169 (1938). — Höber, R.: Physikalische Chemie der Zelle u. d. Gewebe (1922), S. 677. — Hofstetter, I. R.: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 611. — Hunzinger, W. A., u. G. A. Ortelli: Schweiz. med. Wschr. **1954**, 1339. — Januschke, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **61**, 363 (1909). — Krautwald, A., u. A. Stuhlmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 152 (1938). — Mayr, F., A. Holasek, N. Geyer u. H. Flaschka: Wien. med. Wschr. **1954**, 810. — McLean, F. C., and A. B. Hastings: J. of Biol. Chem. **107**, 337 (1934). — Naess, K.: Acta pharmakol. (Kopenh.) **8**, 137 (1952). — Pribil, R.: Coll. českostor. chem. Commun. **14**, 413 (1949). — Rothlin, E.: Coimbra medica **2**, 7 (1935). — Schwarzenbach, G. u. Mitarb.: Helvet. chim. Acta **31**, 1030 (1948). — Spencer, H., and I. Lewin: J. Clin. Invest. **31**, 1023 (1952). — Werle, E., u. K. Semm: Arzneimittel-Forsch. **2**, 307 (1952). — Zickraf, H.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 412 (1953).

Dr. Günter Dentzer, Pharmakologisches Institut der Karl-Marx-Universität, Leipzig C 1, Härtelstr. 16/18.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 152—162 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung und Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen, z. Zt. Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut (Direktor: Prof. Dr. F. Hildebrandt).

# Zur Frage der Beziehungen zwischen Strophanthintoxicität und Größe der Coronardurchblutung.

Von

J. Dörner.

Unter technischer Mitarbeit von E. Paas.

Mit 3 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 23. Februar 1955.)*

In Versuchen an Meerschweinchen hat Hildebrandt festgestellt, daß bei intravenöser Infusion von k-Strophanthin die Dosis letalis erniedrigt ist, wenn gleichzeitig Oxyäthyltheophyllin (Cordalin) mitinfundiert wird. Da von letzterem bekannt ist, daß es die Coronargefäße erweitert, ergab sich die Frage, ob die Toxicitätserhöhung auf eine Mehrdurchblutung des Herzens und eine damit verbundene stärkere Glykosidzufuhr zum Herzen zurückzuführen ist.

Die Literaturangaben über die Änderungen der Digitalistoxicität bei Verwendung von Pharmaka, denen eine Coronarwirkung zugeschrieben wird, sind uneinheitlich. Preobraschensky stellte an Katzen nach Coffeinvorbehandlung eine Steigerung der letalen Strophanthindosis fest. Wiethaup fand an denselben Tieren eine Erhöhung der Toxicität von Digipurat nach Vorbehandlung mit Coffein, Theobromin, Sympatol, und den aus tierischen Geweben gewonnenen Präparate Lacarnol, Eutonon und Padutin. Am Herzlungenpräparat von Katzen wurde nach Kohn die tödliche Dosis von g-Strophanthin durch vorherige Injektion von Coffein oder Theophyllin herabgesetzt. Derselbe Autor fand zusammen mit Costopanagiotis an intakten Katzen, daß Coffein zu einer Resistenzerhöhung, Theophyllin und Theobromin zu einer Resistenzherabsetzung gegenüber tödlichen Digipuratlösungen führten. Bei dekapitierten Katzen wirkte dagegen Coffein wie Theophyllin und Theobromin. Lendle berichtete von Abnahme der Strophanthintoxicität nach kleinen Coffeindosen, während er nach größeren keine Veränderung fand. Amylnitrit führte zu geringer Abschwächung und Kallikrein zu geringer Erhöhung der toxischen Strophanthinwirkung. Am Herzlungenpräparat von Katzen wurde nach Weese u. Wiegand nach kleinen Dosen Coffein mehr Strophanthin gebraucht, nach Dosen, wie sie Kohn anwandte, dagegen weniger. In ähnlicher Richtung liegen die Ergebnisse von Haag u. Woodley bei intakten Katzen. Keine eindeutige Beeinflussung der Digitalisgiftigkeit (Digipurat) durch Lacarnol stellten Sumbal u. Svec fest. Nach Rave wird bei Katzen die Digilanid- und Scillarentoxicität durch niedrige und hohe Coffeindosen erhöht, die Strophanthin- und Digipurattoxicität durch hohe Coffein- und Theobromindosen ebenfalls gesteigert, durch niedrige dagegen herabgesetzt.

Das Problem der Beziehungen zwischen Digitalistoxicität und Größe der Coronardurchblutung kann einer weiteren Klärung nur zugeführt

werden, wenn die Herzkranzgefäßdurchblutung gleichzeitig gemessen wird. Da dies bei allen erwähnten Arbeiten nicht der Fall war und uns auch sonst aus der Literatur keine diesbezüglichen Angaben bekannt sind, versuchten wir, die Frage unter dieser Voraussetzung zu prüfen.

## Methodik.

Die Versuche wurden an 27 Hunden im mittleren Gewicht von 10—15 kg und an 30 Meerschweinchen durchgeführt. Narkose der Hunde: 4 mg/kg Morphin i. m., $^1/_2$Std später 0,5 cm³/kg Pernocton[1] i. m.; Narkose der Meerschweinchen: 150 mg/100 g Urethan s. c.

Künstliche Beatmung der Hunde; das Atemvolumen wurde so eingestellt, daß die Tiere gerade nicht spontan atmeten. Spontanatmung der Meerschweinchen. Bei den Hunden Messung der Coronardurchblutung an der A. coron. d. mit der Diathermie-Thermostromuhr nach Rein. In fast allen Versuchen kam dasselbe Thermoelement vom Typ A zur Anwendung. Dieses Element hatte in siebenmaliger Eichung mit Kochsalzlösung und Blut in derselben Stromrichtung einen Exponenten von 0,44—0,48 ergeben. Es besaß damit die notwendigen Voraussetzungen für die Berechnung prozentualer Durchströmungsänderungen. Leider konnte die Coronardurchblutung nicht während der ganzen Versuchsdauer registriert werden, da nach Infusion von 30 -60% der Dosis letalis es zum Auftreten von Spontanatmung kam, die wegen der damit verbundenen starken Veränderungen der Elementnullinie ein weiteres Messen der Coronardurchblutung mit der Reinschen Stromuhr unmöglich machte. Wir haben auf diese Tatsache schon an anderer Stelle hingewiesen (Dörner u. Kuschke). Fast immer wurde jedoch das Maximum der Durchblutungssteigerung vor Einsetzen der Spontanatmung erreicht. Wir haben die tödliche Strophanthindosis in Beziehung gesetzt:

a) zur maximalen Durchblutungssteigerung;

b) zur durchschnittlichen Durchblutungssteigerung bis zum Auftreten der Spontanatmung;

c) zur durchschnittlichen Durchblutungssteigerung während der ganzen Versuchsdauer. Bei letzterem Vorgehen haben wir die prozentuale Durchblutungszunahme, die vor dem Auftreten von Spontanatmung vorhanden war, auch für die restliche Versuchsdauer eingesetzt. Wegen dieser Extrapolation entspricht der dabei erhaltene Wert nicht exakt dem wirklichen Durchschnittswert. Dieser muß etwas geringer angenommen werden, da gegen Versuchsende die Coronardurchblutung wieder zurückging. Da eine exakte Erfassung der während des ganzen Versuchs vorhandenen durchschnittlichen Durchblutungssteigerung aus methodischen Gründen nicht möglich war, sollen die nach c) errechneten Werte auch nur eine Ergänzung der nach a) und b) ermittelten Durchblutungssteigerungen darstellen.

Neben der Coronardurchblutung registrierten wir bei einem Teil der Tiere die Durchströmung in der V. cava thor. inf. Daneben wurden bei sämtlichen Tieren der arterielle Blutdruck mit dem photoelektrischen Transmissionsmanometer nach Rein in einer A. fem. und der venöse Druck im rechten Vorhof mit dem Wismut-Tauchspulenmanometer gemessen. Aus dem Verhalten des Venendrucks konnten wir uns über den Zustand der Atmung informieren, da das Auftreten von spontanen Atemzügen sich in starken Schwankungen desselben bemerkbar machte.

Die Dauerinfusionen wurden mit g-Strophanthin nach der Methode von Hatcher vorgenommen, bei den Hunden in eine V. fem., bei den Meerschweinchen in

[1] Pernocton: 10%ige wäßrige Lösung des Natriumsalzes der $\beta$-bromallyl-sec.-butylbarbitursäure.

eine V. jugul. Infusionsgeschwindigkeit bei ersteren 0,2 mg/kg/Std, bei letzteren 0,2 mg/Tier/Std. Bei diesen Dosierungen war die Infusionsdauer der beiden Tierarten gleichlang (fast 40 min). Infundierte Flüssigkeitsmenge 27 oder 14 $cm^3$/Std. Als coronarerweiternde Substanzen kamen zur Anwendung: beim Hund Oxyäthyltheophyllin (Cordalin; 3,33 mg/kg/min), Adenosintriphosphorsäure (0,5—5,0 mg/kg/min), Papaverin. hydrochl. (0,5—1,0 mg/kg/min) und Natriumnitrit (1,0 bis 5,0 mg/kg/min); beim Meerschweinchen Oxyäthyltheophyllin (3,33 mg/Tier/min) und Papaverin. hydrochl. (0,17—0,33 mg/Tier/min). Bei 12 Meerschweinchen wurden die Versuche mit k-Strophanthin anstatt g-Strophanthin durchgeführt. Alle Substanzen wurden in entsprechender Konzentration mit dem Strophanthin in einer Mischspritze aufgezogen und infundiert. Der Zeitpunkt des Exitus der Tiere wurde bei den Hunden aus der Blutdruckkurve, bei den Meerschweinchen mittels Elektrokardiographen festgestellt.

Statistische Auswertung: Berechnung des mittleren Fehlers des Mittelwertes in den Tabellen und des Korrelationskoeffizienten in den Diagrammen; Mittelwertsvergleich der Ergebnisse der Meerschweinchenversuche unter Anwendung des $t$-Testes. Signifikansgrenze $P = 1\%$.

## Ergebnisse.

### *I. Hunde.*

1. *Strophanthin allein.* Die Ergebnisse der Strophanthinversuche sind aus Tab. 1 zu entnehmen. Die mittlere tödliche Dosis betrug danach 125 $\gamma$/kg. Dieser Wert liegt niedriger als die bei etwas höherer Infusionsgeschwindigkeit früher von uns gefundene Dosis letalis für Strophoral (184 $\gamma$/kg). Es stimmt mit den Literaturangaben gut überein (siehe Dörner).

Tabelle 1. *Hunde. Dauerinfusion von g-Strophanthin.*

| Tiergewicht in kg | Konzentration des g-Strophanthins X $10^4$ | Infusionsgeschwindigkeit $cm^3$/Std | Infusionsdauer in min | Dos. let. $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|---|
| 14,0 | 2,0 | 14 | 38,5 | 128 |
| 19,0 | 2,7 | 14 | 40,5 | 134 |
| 16,6 | 1,2 | 27 | 30,9 | 103 |
| 16,0 | 2,3 | 14 | 40,3 | 134 |
| Im Mittel: | | | | $125 \pm 7{,}4$ |

Abb. 1 zeigt, daß die Coronardurchblutung sich bis zum Auftreten der Spontanatmung nicht wesentlich veränderte. Sie nahm in 2 Versuchen geringgradig zu. Eine Abnahme konnten wir nicht beobachten.

Der Blutdruck hielt sich bis zum Versuchsende oder bis kurz vorher mit einigen Schwankungen im Durchschnitt auf dem Ausgangsniveau.

2. *Strophanthin mit Oxyäthyltheophyllin.* Bei dieser Kombination war der Strophanthinverbrauch bei der von uns gewählten Dosierung auf durchschnittlich 95 $\gamma$/kg herabgesetzt (Tab. 2), die Strophanthintoxicität damit im Mittel um 24% erhöht. Die Streuung der Werte war größer als bei Strophanthin allein.

Tabelle 2. *Hunde. Dauerinfusoin von g-Strophanthin + Oxyäthyltheophyllin. Infusionsgeschwindigkeit* 27 cm³/*Std.*

| Tiergewicht in kg | Konzentration des g-Strophanthins X $10^6$ | Konzentration des Oxyäthyltheophyllins | Infusionsdauer in min | Verbrauch Oxyäthyltheophyllin mg/kg | Dos. let. g-Strophanthin $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|---|---|
| 10,0 | 7,4 | 1:14 | 31,3 | 104 | 104 |
| 12,5 | 9,3 | 1:11 | 18,3 | 61 | 61 |
| 11,2 | 8,3 | 1:12 | 38,5 | 128 | 128 |
| 9,8 | 7,3 | 1:14 | 23,7 | 79 | 79 |
| 10,0 | 7,4 | 1:14 | 30,8 | 103 | 103 |
| 11,3 | 8,4 | 1:12 | 29,2 | 97 | 97 |
| Im Mittel: | | | | | $95 \pm 9{,}4$ |

Aus Abb. 1 geht nun hervor, daß eine deutliche Abhängigkeit der Strophanthintoxicität von dem Verhalten der Coronardurchblutung bestand: je stärker letztere durch das mitinfundierte Oxyäthyltheophyllin

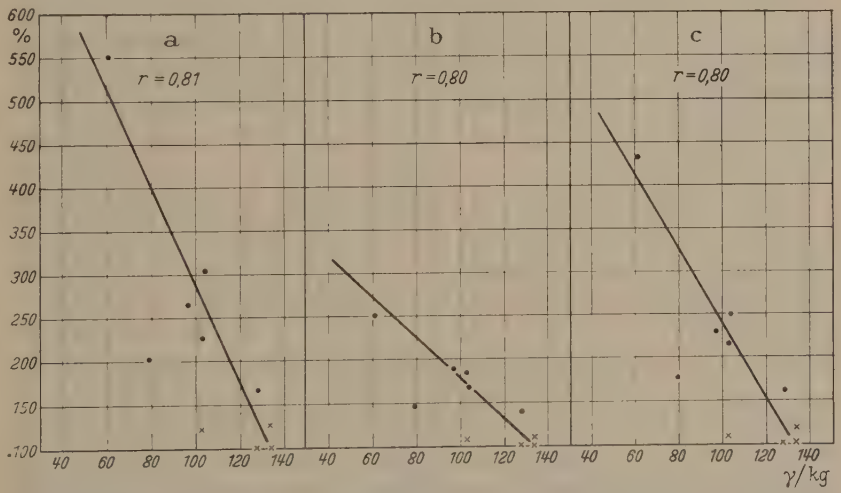



Abb. 1. Hunde. X Versuche mit g-Strophanthin allein; • Versuche mit g-Strophanthin + Oxyäthyltheophyllin. Abszisse: Dosis letalis des g-Strophantins in $\gamma$/kg. Ordinate: Zunahme der Coronardurchblutung, Ausgangsdurchblutung 100%. *a* Maximale Durchblutungszunahme; *b* Durchschnittliche Durchblutungszunahme bis zum Auftreten von Spontanatmung; *c* Durchschnittliche Durchblutungszunahme während der ganzen Versuchsdauer (siehe unter Methodik). Korrelationskoeffizienten signifikant ($P < 1\%$).

in Richtung einer Mehrdurchblutung verändert wurde, desto geringer war die bis zum Exitus letalis verbrauchte Strophanthindosis. Diese Abhängigkeit ist signifikant ($P < 1\%$).

Der Verlauf der Blutdruckkurve zeigte insofern Unterschiede gegenüber dem Blutdruckverhalten bei Strophanthin allein, als es durchschnittlich 13 min vor dem Exitus zu einem allmählichen Blutdruckabfall kam.

3. *Strophanthin mit Papaverin.* Die Dosis letalis des Strophanthins betrug hier im Mittel 87 $\gamma$/kg (Tab. 3). Die Resistenz war damit um durchschnittlich 30% herabgesetzt.

Tabelle 3. *Hunde. Dauerinfusion von g-Strophanthin + Papaverin. hydrochl. Infusionsgeschwindigkeit 27* cm³/*Std.*

| Tiergewicht in kg | Konzentration des g-Strophanthins X $10^5$ | Konzentration des Papaverins | Infusionsdauer in min | Verbrauch Papaverin mg/kg | Dos. let. g-Strophanthin $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|---|---|
| 9,0 | 6,7 | 1:50 | 14,5 | 14,5 | 48 |
| 11,0 | 8,1 | 1:82 | 28,2 | 14,1 | 94 |
| 15,5 | 11,5 | 1:33 | 29,8 | 26,2 | 99 |
| 11,7 | 8,7 | 1:38 | 28,8 | 29,2 | 96 |
| 9,0 | 6,7 | 1:46 | 21,9 | 23,8 | 73 |
| 8,8 | 6,5 | 1:51 | 33,8 | 33,9 | 113 |
| Im Mittel: | | | | | $87 \pm 9{,}4$ |

Abb. 2 zeigt, daß beim Papaverin eine ebenso signifikante Abhängigkeit der verbrauchten Strophanthindosis von der Zunahme der Coronardurchblutung bestand wie beim Oxyäthyltheophyllin. Die Blutdruckveränderungen glichen denjenigen beim Oxyäthyltheophyllin.

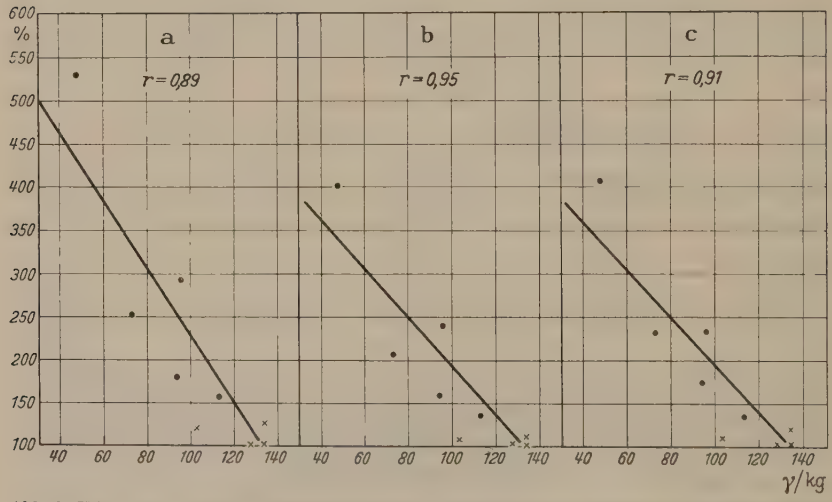



Abb. 2. Wie Abb. 1. Anstatt Oxyäthyltheophyllin wurde Papaverin verwendet. Korrelationskoeffizienten signifikant ($P < 1\%$).

4. *Strophanthin mit Natriumnitrit.* Wurde mit dem Strophanthin gleichzeitig Natriumnitrit als coronargefäßerweiterndes Mittel infundiert, dann war die tödliche Strophanthindosis ebenfalls verringert, und zwar bei den von uns gewählten Dosierungen um durchschnittlich 25% (Tab. 4).

Tabelle 4. *Hunde. Dauerinfusion von g-Strophanthin + Natriumnitrit. Infusionsgeschwindigkeit 27* cm³/*Std.*

| Tiergewicht in kg | Konzentration des g-Strophanthins X $10^6$ | Konzentration des Na-Nitrits | Infusionsdauer in min | Verbrauch Na-Nitrit mg/kg | Dos. let. g-Strophanthin $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|---|---|
| 12,0 | 8,9 | 1: 7,5 | 25,3 | 127 | 84 |
| 12,5 | 9,3 | 1:18,0 | 29,3 | 59 | 98 |
| 11,5 | 8,5 | 1:19,6 | 28,2 | 56 | 94 |
| 12,5 | 9,3 | 1: 7,2 | 20,5 | 103 | 68 |
| 11,5 | 8,5 | 1:39,0 | 36,0 | 36 | 120 |
| 10,5 | 7,8 | 1:28,6 | 30,4 | 46 | 101 |
| Im Mittel: | | | | | 94 ± 7,1 |

Bei dem Versuch, die letale Strophanthindosis zu den Veränderungen der Coronardurchblutung in Beziehung zu setzen, ließ sich für das Natriumnitrit keine eindeutige Abhängigkeit der Strophanthintoxicität von der Stärke der Herzkranzgefäßdurchblutung aufzeigen (Abb. 3).

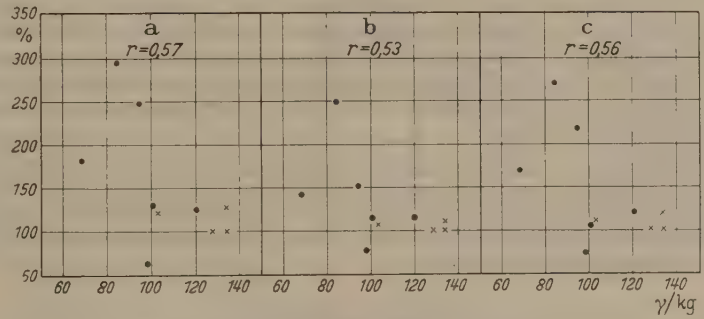



Abb. 3. Wie Abb. 1. Anstatt Oxyäthyltheophyllin wurde Natriumnitrit verwendet. Korrelationskoeffizienten nicht signifikant ($P > 5\%$).

Dagegen ergab sich eine Abhängigkeit des Todeseintritts von der Menge des infundierten Natriumnitrits: je höher die Natriumnitritkonzentration, desto früher kam es zum Exitus der Tiere (Tab. 4); d. h. der Tod der Tiere wurde hier mehr oder weniger stark durch die toxische Wirkung des Natriumnitrits mitbestimmt. Letztere war auch an der schon bald nach Versuchsbeginn auftretenden dunklen Verfärbung des Blutes als Zeichen der Methämoglobinbildung zu erkennen.

Der Blutdruck fiel in fast allen Versuchen schon bald nach Beginn der Dauerinfusion in verschiedenem Ausmaße ab.

5. *Strophanthin mit Adenosintriphosphorsäure.* Auch bei Kombination des Strophanthins mit Adenosintriphosphorsäure war in 3 Versuchen die Strophanthinresistenz um durchschnittlich 23% herabgesetzt (Tab. 5).

Wie beim Natriumnitrit ließ sich auch bei der Adenosintriphosphorsäure die Toxicitätserhöhung nicht oder nicht ausschließlich auf eine

Tabelle 5. *Hunde. Dauerinfusion von g-Strophanthin + Adenosintriphosphorsäure. Infusionsgeschwindigkeit 27* cm³/*Std.*

| Tiergewicht in kg | Konzentration des g-Strophanthins X $10^5$ | Konzentration der ATP | Infusionsdauer in min | Verbrauch ATP mg/kg | Dos. let. g-Strophanthin $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|---|---|
| 12,5 | 9,3 | 1: 7,2 | 28,5 | 143 | 95 |
| 10,0 | 7,4 | 1:82,0 | 27,8 | 15 | 93 |
| 12,0 | 8,9 | 1:17,0 | 31,0 | 68 | 103 |
| Im Mittel: | | | | | 97 ± 3,1 |

Steigerung der Coronardurchblutung zurückführen. Nur bei Verwendung der höchsten von uns gewählten Konzentration kam es zu einer stärkeren bis Versuchsende anhaltenden Zunahme der Herzkranzgefäßdurchblutung bei stark abgefallenem Blutdruck.

In den beiden anderen Versuchen wurde die Coronardurchblutung bei wenig verändertem Blutdruck nur für 4 bzw. 8 min gesteigert, um während der übrigen Versuchszeit auf oder etwas unterhalb Ausgangsniveau zu bleiben. Die Dosierung zur Herbeiführung einer Durchblutungssteigerung war hier offenbar zu gering. Die in diesen Fällen trotzdem erhöhte Strophanthintoxicität dürfte mit den durch die ATP hervorgerufenen Störungen der Erregungsüberleitung im Herzen, Blockerscheinungen und Kammerflimmern zusammenhängen. Solche Effekte, die sich zu den toxischen Strophanthinwirkungen synergistisch verhalten, sind von der ATP bei höherer Dosierung bekannt.

6. Beziehungen zwischen der prozentualen Zunahme der *Coronardurchblutung* und der Dosis Strophanthin, nach der es zum Auftreten von *Spontanatmung*, also zu einer Steigerung des Atembedürfnisses kam, konnten nicht aufgezeigt werden.

### *II. Meerschweinchen.*

1. *Strophanthin allein.* Wir sind von der optimalen Infusionsdauer von etwa 15 min abgewichen und haben Konzentration und Infusionsgeschwindigkeit so gewählt, daß der Exitus nach durchschnittlich derselben Zeit erfolgte wie bei den Hunden (39 min). Unter diesen Bedingungen betrug die Dosis letalis des g-Strophanthins im Durchschnitt 389 $\gamma$/kg (Tab. 6).

Tabelle 6. *Meerschweinchen. Dauerinfusion von g-Strophanthin (1,4 · $10^5$). Infusionsgeschwindigkeit 14* cm³/*Std.*

| Tiergewicht in g | Infusionsdauer in min | Dos. let. $\gamma$/kg |
|---|---|---|
| 329 | 32,5 | 329 |
| 339 | 43,0 | 435 |
| 310 | 37,5 | 403 |
| 356 | 41,5 | 389 |
| Im Mittel: | | 389 ± 22,2 |

2. *Strophanthin mit Oxyäthyltheophyllin.* Bei dieser Kombination war die Dosis letalis des Strophanthins auf 223 $\gamma$/kg herabgesetzt (Tab. 7), ein gegenüber den Kontrolltieren signifikanter Unterschied. Die Toxicität war damit um durchschnittlich 43% erhöht, d. h. stärker als bei den Hunden.

Tabelle 7. *Meerschweinchen. Dauerinfusion von g-Strophanthin ($1{,}4 \cdot 10^5$) + Oxyäthyltheophyllin (1:70). Infusionsgeschwindigkeit 14* cm³/*Std.*

| Tiergewicht in g | Infusionsdauer in min | Verbrauch Oxyäthyltheophyllin mg/kg | Dos. let. g-Strophanthin $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|
| 392 | 17,8 | 151 | 151 |
| 385 | 40,8 | 353 | 353 |
| 397 | 29,5 | 248 | 248 |
| 412 | 23,5 | 190 | 190 |
| 320 | 17,0 | 177 | 177 |
| 319 | 21,0 | 219 | 219 |
| Im Mittel: | | | $223 \pm 29{,}4$ |

Dabei ist zu beachten, daß die Tiere dieser Versuchsserie im Durchschnitt 37 g schwerer waren als die Tiere der Tab. 6, so daß dadurch der Wert von 43% eher als zu niedrig angesehen werden müßte. Andererseits sind wegen der im Vergleich zu 1) kürzeren Versuchsdauer keine so großen Verluste durch Zerstörung und Elimination in Rechnung zu stellen. Infolgedessen ist bei Errechnung der Empfindlichkeitssteigerung zu berücksichtigen, daß die aus den Werten der Tab. 6 errechnete mittlere tödliche Dosis etwas zu groß ist, und zwar um den Betrag des während der längeren Versuchsdauer zerstörten oder eliminierten Strophanthins. Es ist daher möglich, daß die Toxicitätssteigerung von 43% bei der Kombination mit Oxyäthyltheophyllin als etwas zu hoch angesehen werden muß (vgl. jedoch später).

3. *Strophanthin mit Papaverin.* Auch hier war die Dosis letalis des Strophanthins erniedrigt (Tab. 8), der Unterschied gegenüber den Kontrolltieren ist aber wegen des ersten in der Tabelle angeführten Versuches, dessen Ergebnis von den übrigen stark abweicht, nicht signifikant.

Tabelle 8. *Meerschweinchen. Dauerinfusion von g-Strophanthin ($1{,}4 \cdot 10^5$) + Papaverin. hydrochl. Infusionsgeschwindigkeit 14* cm³/*Std.*

| Tiergewicht in g | Konzentration des Papaverins | Infusionsdauer in min | Verbrauch Papaverin mg/kg | Dos. let. g-Strophanthin $\gamma$/kg |
|---|---|---|---|---|
| 334 | 1: 700 | 44,0 | 44 | 439 |
| 361 | 1: 700 | 31,0 | 29 | 286 |
| 392 | 1: 700 | 37,5 | 32 | 319 |
| 341 | 1: 700 | 33,0 | 33 | 326 |
| 290 | 1: 900 | 26,0 | 23 | 299 |
| 360 | 1:1400 | 32,0 | 15 | 296 |
| 323 | 1:1400 | 32,5 | 17 | 335 |
| 310 | 1:1400 | 31,0 | 17 | 333 |
| Im Mittel: | | | | $329 \pm 17{,}0$ |

4. *Versuche mit k-Strophanthin allein und in Kombination mit Oxyäthyltheophyllin bei optimaler Infusionsgeschwindigkeit.* Bei 12 Meerschweinchen führten wir Versuche mit k-Strophanthin bei optimaler Infusionsdauer (durchschnittlich 16 min) durch. Die Dosis letalis für k-Strophanthin betrug hierbei bei 7 Tieren im Mittel 572 $\gamma$/kg, d. h. sie war fast um 200 $\gamma$ höher als bei Verwendung von g-Strophanthin. Bei Kombination mit Oxyäthyltheophyllin (Konzentration des letzteren 1:13) war die tödliche Dosis des k-Strophanthins bei 5 Tieren auf durchschnittlich 338 $\gamma$/kg signifikant herabgesetzt. Es bestand somit eine Resistenzerniedrigung von 41%, d. h. fast die gleiche Empfindlichkeitssteigerung wie bei den unter 2. erwähnten Versuchen der gleichen Kombination mit g-Strophanthin und verlängerter Infusionsdauer. Auf eine tabellarische Wiedergabe dürfen wir wegen der prinzipiellen Gleichartigkeit mit den vorherigen Befunden verzichten. Wir können aus diesem Ergebnis schließen, daß die an obiger Stelle diskutierte Möglichkeit einer nicht ganz exakten Errechnung der Toxicitätsänderung wegen der relativ stark veränderten Versuchsdauer keine große Bedeutung hat.

## Besprechung der Ergebnisse.

Wir konnten zeigen, daß bei Hund und Meerschweinchen die Strophanthintoxicität bei gleichzeitiger Infusion coronarerweiternder Substanzen erhöht war. In den Meerschweinchenversuchen konnte die Coronardurchblutung nicht gemessen werden. In den Hundeversuchen war die Empfindlichkeitssteigerung von dem Ausmaß der Durchblutungszunahme der Herzkranzgefäße abhängig. Der tierexperimentelle Nachweis solcher Beziehungen zwischen Strophanthin- bzw. Digitalistoxicität und Größe der Coronardurchblutung ist an zwei Voraussetzungen gebunden:

1. Es dürfen als coronarerweiternde Pharmaka nur Substanzen verwendet werden, die in der notwendigen Dosierung selbst nicht toxisch wirken oder sonstwie einen synergistischen oder antagonistischen Einfluß auf die toxischen Strophanthin- und Digitaliswirkungen ausüben. Solche Pharmaka scheinen das von uns untersuchte Oxyäthyltheophyllin, wahrscheinlich auch das Theophyllin selbst und seine anderen Derivate, und das Papaverin zu sein. Beim Natriumnitrit und der Adenosintriphosphorsäure dagegen standen die toxischen Eigenwirkungen beider Pharmaka im Vordergrund und bestimmten den vorzeitigen Herzstillstand.

Unter diesem Gesichtspunkt wäre zu prüfen, inwieweit das Coffein, auf dessen Anwendung die Literaturbefunde zum großen Teil beruhen, durch seine zentrale Wirkungskomponente nicht in antagonistischem Sinne die toxische Strophanthinwirkung am Herzen beeinflußt und damit den Herzstillstand hinausschiebt, was nicht ausschließt, daß darüber hinaus noch syn- oder antagonistische Vorgänge am

Herzen selbst sich abspielen können. Die eingangs erwähnten Literaturbefunde sind wenigstens zum Teil in diesem Sinne zu deuten.

2. Die Durchblutungssteigerung muß ein gewisses Ausmaß erreichen, andernfalls liegen die Ergebnisse innerhalb des normalen Streuungsbereiches der Methode und ein eventueller signifikanter Unterschied wäre nur mit größeren Versuchsserien aufzuzeigen. Auf Grund der Abb. 1 und 2 möchten wir annehmen, daß eine Durchblutungszunahme von mindestens 20—25% die untere Grenze darstellt, von der ab Verkürzungen der Versuchsdauer zu erwarten sind.

Es erscheint uns auch aus diesem Grunde fraglich, ob das Coffein mit seiner im Verhältnis zum Theophyllin und Theobromin schwächeren gefäßdilatierenden Wirkung und seinen vielseitigen Angriffspunkten sich für den speziellen Zweck einer Prüfung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Problemstellung eignet.

Von praktischer Bedeutung dürften unsere Ergebnisse insofern sein, als bei gleichzeitiger Verabreichung von Strophanthin bzw. Digitalis und coronarerweiternden Pharmaka in praxi die Glykosiddosis tunlichst herabzusetzen ist. Auch ist es nicht ausgeschlossen, daß die gesteigerte Digitalisempfindlichkeit insuffizienter Herzen zum Teil über die in solchen Fällen gesteigerte Coronardurchblutung zustande kommt.

## Zusammenfassung.

In Versuchen an 27 Hunden unter Messung der Coronardurchblutung und an 30 Meerschweinchen wurden die Veränderungen der Strophanthintoxicität bei Dauerinfusion nach Hatcher bei gleichzeitiger Verabreichung coronarerweiternder Substanzen (Oxyäthyltheophyllin, Papaverin, Natriumnitrit, Adenosintriphosphorsäure) geprüft. Bei allen Substanzen war die Dosis letalis des Strophanthins herabgesetzt. Für das Oxyäthyltheophyllin und das Papaverin ergab sich dabei eine deutliche Abhängigkeit der verbrauchten Strophanthindosis von der Zunahme der Coronardurchblutung. Beim Natriumnitrit und der Adenosintriphosphorsäure wurde der Tod der Tiere durch die toxischen Eigenwirkungen beider Substanzen mitbestimmt.

## Literatur.

Dörner, J.: Experimentelle Untersuchungen zur oralen Wirksamkeit von Strophanthin (Strophoral), zugleich ein Beitrag zur Frage der Wirkungsweise toxischer Strophanthindosen. Z. Kreislaufforsch. **40**, 393 (1951). — Dörner, J., u. H. J. Kuschke: Zur Frage einer pharmacodynamischen Wirkung der aus Crataegus gewonnenen Triterpensäuren (Crataegussäuren). Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 24 (1955). — Hildebrandt, F.: Ist bei gleichzeitiger Anwendung coronargefäßerweiternder Mittel die übliche Strophanthindosis angebracht? Dtsch. med. Wschr. **1955**, 226. — Haag, H. B., and J. D. Woodley: The effect of caffeine and theobromine upon digitalis toxicity; an experimental study. J. of Pharmacol. **53**, 465 (1935). — Kohn, R.: Zur experimentellen Veränderung der Digitalisgiftigkeit. IV. Mitt.: Untersuchungen am isolierten Froschherzen und am HLP von Katzen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **173**, 341 (1933). —

Kohn, R., u. B. C. Costopanagiotis: Zur experimentellen Veränderung der Digitalisgiftigkeit. II. Mitt.: Die Digitaliskombination mit einigen Purinderivaten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **170**, 226 (1933). — Lendle, L.: Über herzwirksame Glykoside. II. Mitt.: Pharmakologische Beeinflussung der Strophanthinwirkung am Herzen bei der Titration nach Hatcher. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 585 (1933). — Preobraschensky, A. M.: Coffein als Herztonicum nach Versuchen am Katzenherz. Z. exper. Med. **71**, 72 (1930). — Über die Schutzwirkung von Coffein bei Strophanthinvergiftung. Z. exper. Med. **96**, 608 (1935). — Rave, B.: Über die Beeinflussung der Digilanidwirkung durch Coffein und Theobromin. Inaug. Diss. Münster 1936. — Sumbal, J., u. F. Svec: Wirkung des Lacarnols auf die Digitalisgiftigkeit. Cas. lék. cesk. **1936**, 12; zit. nach Ber. Physiol. **93**, 215 (1936). — Weese, H., u. Ch. Wiegand: Zur Begründung der Kombinationstherapie Digitalis-Coffein. Medizin und Chemie II, I. G. Farbenindustrie Leverkusen 1934. — Wiethaup, H.: Die Beeinflussung der Digitaliswirkung durch koronarerweiternde Mittel. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **168**, 554 (1932).

Priv.-Doz. Dr. med. J. Dörner, z. Zt. Harvard Med. School, Dept. of Pharmacol. Boston 15, Mass. USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 163—171 (1955).

Aus dem pharmakologischen Laboratorium der Chemischen Fabrik
Dr. F. Raschig G.m.b.H., Ludwigshafen, Rhein.

# Über Amino-Pyridin und seine Derivate.

Von

ELMAR Frhr. von HAXTHAUSEN.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 24. März 1955.)*

Trotz der biologischen Aktivität des Amino-Pyridins (AP) ist über die pharmakologische Wirkung dieser Substanz relativ wenig bekannt. Die ältesten Angaben stammen von A. DOHRN u. M. DINGEMANSE. F. H. SHAW u. G. BENTLEY haben 2- und 4-AP gegenüber der durch Morphin hervorgerufenen Atmungslähmung an Kaninchen getestet. Auch über Derivate dieses Moleküls liegt kaum pharmakologisches Untersuchungsmaterial vor. DOHRN hatte azetylierte und alkylierte Verbindungen untersucht. Aus seinen Angaben geht die genaue Stellung der Substitutionsgruppen nicht hervor. Es war das Ziel unserer seit 4 Jahren laufenden Untersuchungen, die pharmakologische Wirkung des Amino-Pyridins und seiner Derivate festzulegen.

## Methodik.

Toxicitätsbestimmungen: Die LD 50 wurde an 20—30 weißen Mäusen und Ratten gleicher Zucht und gleicher Größe durch s. c. oder p. o. Applikation nach der Methode von I. W. TREVAN bestimmt. Bei chronischer Dosierung wurde Ratten, Meerschweinchen und jungen Hunden 1 Monat lang täglich 3 mg/kg i. p. injiziert und laufend Gewicht und Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert; danach erfolgte eine histologische Organuntersuchung.

Blutdruckmessung: An Katzen, Hunden, Meerschweinchen, Ratten mit Hg Manometer an der A. carotis oder A. femoralis. Gelegentlich wurde bei Hunden und Katzen an einer anderen Arterie (A. femoralis sin.) zusätzlich noch ein Federmanometer nach O. FRANK eingeschaltet. Die Hemmung der Blutgerinnung erfolgte durch lokale Anwendung des Präparates Thrombo-Stop (Fa. Turon, Frankfurt). Gegebenenfalls konnte dieses Präparat auch dem Ganztier i. v. beigebracht werden, ohne daß wir sichtbare Schädigungen des Kreislaufs feststellten.

Kreislaufkollaps erzeugten wir: bei *Katzen* mit Dauerinfusion von

a) Avertin[1] 70 mg/kg/Std bei künstlicher Atmung,
b) Evipan$^{-1}$Na 50 mg/kg/Std bei künstlicher Atmung,
c) Histamin 100 $\gamma$/kg/min bei künstlicher Atmung,
d) Dilatol[1] 1 mg/kg/Std bei künstlicher Atmung.

[1] Name gesetzlich geschützt. Avertin = Tribromäthylalkohol, Evipan = N-Methyl-cyclohexenylmethylbarbitursäure, Dilatol = Phenyl-butyl-nor-oxyephedrin.

Dabei wurde zunächst der Blutdruck durch Einzelinjektion auf etwa 80 mm Hg gesenkt und dann durch die Dauerinfusion noch zusätzlich geschädigt. Die Dilatol-Dosis schwankte je nach Alter und Allgemeinzustand der Tiere,

bei *Ratten* durch Einzelinjektion von 1,5 mg/kg Dilatol unter künstlicher Atmung unter Avertin- oder Pernocton-Narkose,

bei *Meerschweinchen* durch 60 mg/kg i. p. Pernocton unter künstlicher Atmung. — Die zu prüfende Substanz (S) wurde stets nach folgendem Schema injiziert:

S-Ephedrin-S
Ephedrin-S-Ephedrin
S-S-Ephedrin
Ephedrin-Ephedrin-S
} Dosis 3 mg/kg

Registrierung der Milz-Kontraktion und der Bewegungen des Darmes i. s. an der Katze erfolgte nach der sogenannten „Schornsteinmethode" (W. Riechert u. P. Trendelenburg).

Die periphere Durchströmung wurde am Hund durch blutige Messung des Stromvolumens der A. femoralis gemessen. Zur Anwendung kam ein Gerät eigener Bauart, ähnlich dem von H. A. Dittmar, K. Mechelke u. E. Nusser beschriebenen. Durch Anwendung eines zweiten Gummifingerlings konnten wir eine Vermischung des Blutes mit Siliconöl vermeiden. Der Elektrodenabstand wurde je nach Größe des Tieres geändert.

Die Atmungsfrequenz wurde bei Ratten und Kaninchen ausgezählt, bei Katzen in Narkose ausgezählt und durch Hebelübertragung von der Bauchdecke registriert. Das Atmungsvolumen maßen wir bei Hunden ohne Narkose mit Hilfe einer 1 l-Gasuhr. Zur Steuerung gebrauchten wir serienmäßige Atmungsventile der Dräger-Werke, deren Widerstand nicht mehr als 4 mm Wassersäule betrug. Nicht alle Hunde eignen sich für den Versuch, jedoch lassen sich bei einiger Übung gute und konstante Werte erzielen. Die Raumtemperatur soll nicht mehr als 20° C betragen.

Die analeptische Wirkung wurde geprüft an Tieren, deren Atmung schwer geschädigt war. Wir erreichten das: an Kaninchen mit 100 mg/kg Morphin, an Katzen durch Dauerinfusion von 40—50 mg/kg/Std. Evipan-Na oder 70 mg/kg/Std Avertin. Weißen Mäusen und Ratten injizierten wir steigende, über die sicher tödliche Dosis noch hinausgehende Dosen Evipan-Na oder Avertin. Diese letztgenannte Methode erfordert einige Übung, da das Analepticum wiederholt injiziert werden muß, um den drohenden Atmungsstillstand aufzuhalten. Die Gefahr der Überdosierung ist ebensogroß wie die der Unterdosierung. Deswegen ist diese Methode für Reihenuntersuchungen nicht geeignet, zumal sich an Katzen und Kaninchen mit geringerem Aufwand fast dasselbe erreichen läßt.

Die Herzwirkung prüften wir am Froschherzen nach der Methode von K. Junkmann. Die Herzen wurden durch Ca-Entzug geschädigt. Die Wirkung auf das Warmblüterherz wurde mit Hilfe des HL Präparates der Ratte gemessen (Methode S. Begovic u. P. Stern, v. Haxthausen). Die Herzfrequenz wurde mittels EKG festgestellt.

Den Einfluß auf die glatte Muskulatur kontrollierten wir am isolierten Meerschweinchen-Ileum nach der Methode von R. Magnus. Zur Anwendung kamen: Histamin und Doryl[1] 1:10 Mill., $BaCl_2$ 1:50000. Der ausgelöste Spasmus sollte zu 75% gehemmt werden. Um dieses zu erreichen, fügten wir die Testsubstanz in einer Konzentration 1:5 Mill. zu und wiederholten diese Zugabe alle 2 min mit derselben Konzentration, jedoch nicht öfter als 5 mal, so daß dann eine Endkonzentration von 1:1 Mill. vorlag. War schon mit geringerer Dosis eine 75%ige Hemmung er-

[1] Name gesetzlich geschützt. Doryl = Carbaminoylcholinchlorid.

reicht, so unterblieb die weitere Zugabe. Einen Bronchospasmus riefen wir an der Katze durch Pilocarpin 1 mg/kg oder Hyperventilation nach der Methode von H. Konzett u. R. Rössler hervor, am Meerschweinchen mit Histamin-Spray 1:1000, unter einem Druck von 1 Atü nach der Methode von P. Kallos u. W. Pagel u. O. Schaumann. Den Meerschweinchen wurde die zu prüfende Substanz 20 min vorher i. m. injiziert, dabei wurden immer 4 Tiere parallel geprüft.

Die zentrale Wirkung registrierten wir an Mäusen, Ratten und Hunden. Bei Mäusen erfolgte die Prüfung mit Hilfe des Kontakttellers von A. W. Forst und einfacher Lauftrommeln mit elektrischer Zählung. Die von M. Kochmann beschriebene Apparatur hat sich mit geringfügigen Abänderungen bei Ratten und Hunden bewährt. Allerdings kommen für diese Methode nur schwere Ratten von mindestens 200 g Gewicht in Frage, ferner sind auch nur bestimmte Hunderassen geeignet.

Sämtliche Tiere wurden nur einmal je Woche für Versuche herangezogen.

Die abgebildeten Kurven stellen typische Ergebnisse aus mindestens 4—5 im Prinzip gleichlaufenden Versuchen dar.

## Ergebnisse.

Das Vergiftungsbild des 2-Aminopyridins an weißen Mäusen ist von Dohrn u. Dingemanse beschrieben: Erregung, tonisch-klonische Krämpfe, Tod im Streckkrampf; dabei ist das von Morphin bekannte Schwänzchen-Phänomen charakteristisch. 3-AP und 4-AP rufen in toxischen Dosen dieselben Erscheinungen hervor. Krampfdosis und letale Dosis liegen hart beieinander. Das Vergiftungsbild der drei Isomeren an Ratten und Katzen ist ähnlich: hochgradige Erregung, Gliederzittern, Tod im Streckkrampf.

Die LD 50 beträgt für weiße Mäuse s. c. 2-AP etwa 0,7 mg/10 g Maus, 3-AP etwa 0,3 mg/10 g Maus, 4-AP etwa 0,05 mg/10 g Maus.

2-AP bewirkt in einer Dosis von 2—3 mg/kg i.v. an der Katze eine Steigerung des mittleren Blutdrucks von 30—40 mm Hg und 20—30 min Dauer. Von 4-AP bewirkt 1 mg/kg bei der Katze eine Blutdrucksteigerung von etwa 50 mm Hg für 90 min und länger. Ebenso dauerten die Vergiftungssymptome an der Ratte erheblich länger als beim 2-AP, nämlich 2 Std und länger gegen 30—40 min. Obwohl das 3-AP an der Maus und der Ratte viel toxischer ist als 2-AP, sahen wir bei der Katze keinen wesentlichen Unterschied zwischen beiden Verbindungen in Bezug auf Dauer und Höhe der Blutdrucksteigerung. Bemerkenswert ist die analeptische Wirkung der Amino-Pyridine. An der Katze wird die durch Avertin- oder Evipan-Na-Dauerinfusion geschädigte Atmung eindeutig gebessert. Wir konnten damit die Befunde von Shaw u. Bentley bestätigen. Zum Vergleich zogen wir Pentetrazol heran. Es ergab sich, daß in tiefster Avertin-Narkose das 2-AP Atmung und Kreislauf besser anregte als Pentetrazol, während beide Substanzen sich bei der Evipan-Vergiftung umgekehrt verhielten.

Eine Herzwirkung der AP ist am Frosch- und Rattenherzen schwach vorhanden. Wir sahen nach beiden Methoden eine positive inotrope Wirkung, wobei 4-AP den stärksten Effekt hatte; angewandte Konzen-

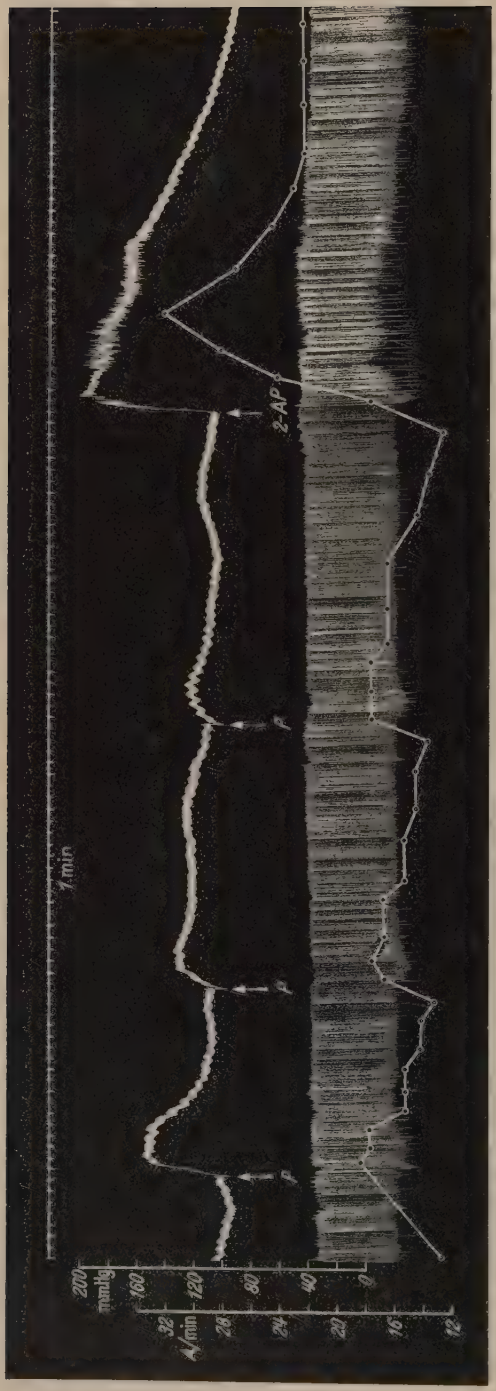


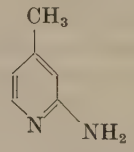

Abb. 1. Katze 2,5 kg, Urethan-Chloralose 70 mg/kg, Avertin-Dauerinfusion 70 mg/kg/Std. Blutdruck mit Quecksilbermanometer registriert, Atmung durch Hebelübertragung von der Bauchdecke. Die ausgezogene Linie entspricht der Atmungsfrequenz pro Minute. Minimalwert = 12, Maximalwert = 32 pro Minute; Zeit in Minuten. *P* 20 mg/kg Pentetrazol; 2 *AP* 8 mg/kg 2 Amino-Pyridin.

tration 1:1 und 1:2 Mill.

Eine Spasmolyse konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Motilitätsmessung an der Maus ergab für 2-AP bei einer Dosis von 2 mg/100 g Maus s. c. eine eindeutige Motilitätshemmung über etwa 60 min.

Gestützt auf die geschilderten Befunde untersuchten wir Derivate des Amino-Pyridins, um zu sehen, ob sich die günstigen Wirkungen noch durch Substitution verbessern ließen. Dies war tatsächlich der Fall. Unter den untersuchten Verbindungen hatte das 4-Methyl-2 Amino-Pyridin besonders bemerkenswerte Eigenschaften.




Versuchsname: W 45 (Raschig)

Handelsname: Askensil[1].

[1] Name gesetzlich geschützt, Regitin = 2-(N-p-Polyl-N-m-oxyphenyl-omino-methyl-)imidazolin, Sympatol = p-Methyl-aminoäthanolphenoltartrat.

*Toxicität.* Mäuse: s. c. etwa 10 mg/100 g p. o. etwa 18 mg/100 g
Ratten: s. c. etwa 18 mg/100 g p. o. etwa 35 mg/100 g.

Die 30 Tage währende tägliche i. p. Injektion von 3 mg/kg an Ratten, Meerschweinchen und jungen Hunden ergab bei der histologischen Untersuchung keinen krankhaften Befund in Herz, Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Gehirn.

*Kreislaufwirkung.* W 45 führte an der Katze in einer Dosis von 1—2 mg/kg i.v. zu einer Steigerung des mittleren Blutdrucks um 30 bis 40 mm Hg für 45—60 min und länger. Systolischer und diastolischer Druck waren gesteigert, was auf eine periphere Vasokonstriktion schließen läßt. Stärke und Dauer der Steigerung waren in hohem Grade von

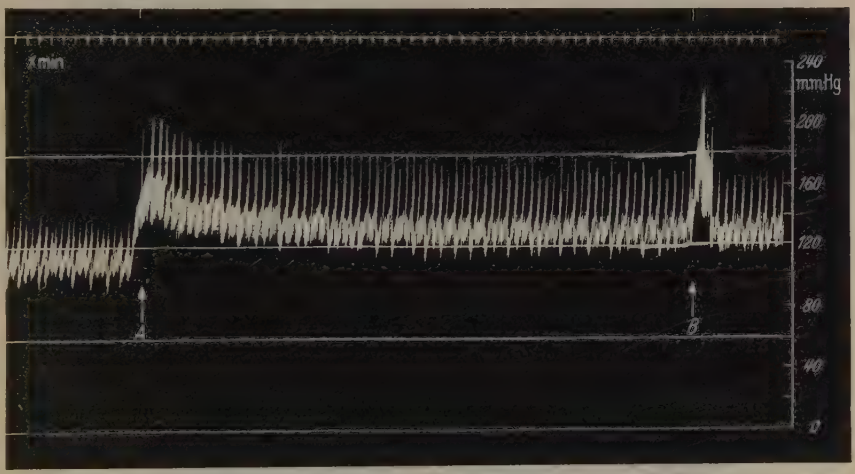



Abb. 2. Hund 26 kg. Narkose, 6 mg/kg Morphin, Urethan-Chloralose 60 mg/kg Pernocton 10 mg/kg. Blutdruckmessung A. femoralis *A* W 45 1 mg/kg. *B* Adrenalin 2 γ/kg.

der Ausgangslage des Blutdrucks abhängig. Klarer lagen die Verhältnisse beim Hund. Hier sahen wir bei einer Dosis von 1 mg/kg i.v. eine Blutdrucksteigerung von etwa 30 mm Hg für 60 min und länger. Die Messung des Blutstromes in der A. femoralis ergab ähnliche Verhältnisse, wie sie von H. A. Dittmar, K. Mechelke, E. Nusser für Adrenalin beschrieben waren. Zunächst sahen wir eine starke Strombeschleunigung von 30—50 sec Dauer, worauf eine Stromvolumen-Minderung verschiedener Dauer folgte, bei vielen Tieren bis zu 60 min; bei anderen ging sie nach etwa 15 min in eine dritte Phase erneuter Flußzunahme über. Welche Ursachen diesem verschiedenen Verhalten bei gleicher Methodik zugrunde lagen, konnte nicht geklärt werden. Im Prinzip gleicht die Kreislaufwirkung des W 45 weitgehend der des Ephedrins.

Auf Grund der völlig verschiedenen chemischen Konstitition waren grundsätzliche Unterschiede zu den Verbindungen der Adrenalin-Ephe-

drin-Reihe zu vermuten. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen bemühten wir uns, diese Unterschiede herauszufinden. Zum Vergleich zogen wir Ephedrin in stets gleicher Dosis heran, weil am nichtgeschädigten Kreislauf Ephedrin und W 45 in gleicher Dosis weitgehend ähnliche Wirkungen hatten. Es ergaben sich eine Reihe wesentlicher Unterschiede.

W 45 verursachte an der Katze keine Nickhautkontraktion und nur bisweilen eine schwache Milzkontraktion, die nicht mit der durch Ephedrin hervorgerufenen zu vergleichen war. Ferner beobachteten wir bei W 45 nie eine Tachyphylaxie. Dies ist insofern wichtig, als bei schwerer Kreislaufschädigung eine wiederholte Ephedrininjektion in der Regel nur noch eine geringe oder auch gar keine Wirkung mehr hat. Es gelang also nicht, durch Ephidrin den schwer geschädigten Kreislauf zu normalisieren. Schäfer u. A. Oberdorf hatten in Versuchen am Hund festgestellt, daß W 45 den durch Dilatol hervorgerufenen Kollaps aufhebt. Wir konnten das in Versuchen an Katzen und Ratten bestätigen. Ephedrin hat bei schwerem Dilatol-Kollaps nur noch eine geringe Wirkung, W 45 dagegen in allen Versuchen eine wesentlich bessere. Dabei war es gleichgültig, ob W 45 vor oder nach Ephedrin injiziert war.

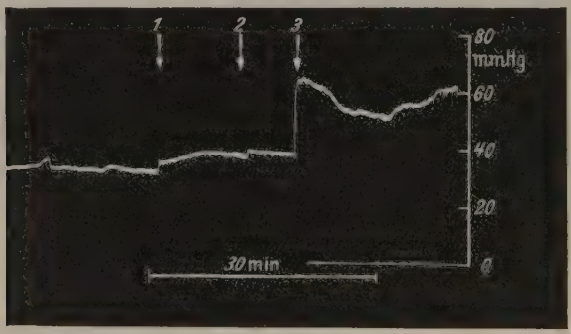



Abb. 3. Ratte 240 g. Narkose: Pernocton 80 mg/kg künstliche Atmung. Dilatol 1,5 mg/kg. 1 und 2 = je 3 mg/kg Ephedrin, 3 = 3 mg/kg W 45.

Yohimbin, Ergotamin, Regitin[1] heben in geeigneter Dosis die Wirkung der Sympathicomimetica der Adrenalin-Ephedrin-Reihe weitgehend auf. Dies trifft hinsichtlich des W 45 nicht zu. Eine Dosis der angeführten Sympathicolytica, die die Ephedrin- oder Sympatol[1]-Wirkung zu 95% aufhob, hemmte die Wirkung des W 45 zu 40—50%. Zur Anwendung kamen Dosen Regitin: 0,8 mg/kg, Yohimbin: 1 mg/kg, Ergotamin: 1,5 mg/kg. Im Gegensatz zu den Befunden, die Schäfer u. A. Oberdorf am Hund erhoben hatten, konnten wir an der Katze fest-

[1] Name gesetzlich geschützt, Regitin = 2-(N-p-Polyl-N-m-oxyphenyl-ominomethyl-)imidazolin, Sympatol = p-Methylaminoäthanolphenoltartrat.

stellen, daß der Histamin-Kollaps durch W 45 günstig zu beeinflussen war. Auch hier versagte Ephedrin.

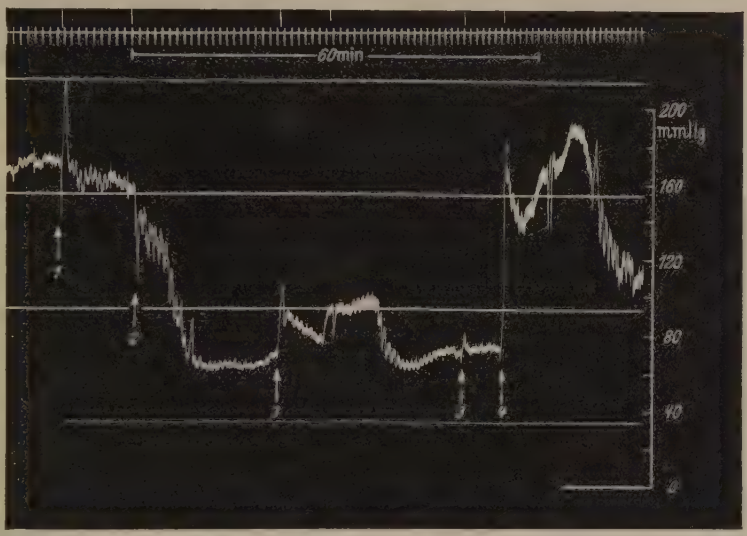



Abb. 4. Katze 2,1 kg. Narkose: Urethan-Chloralose. Blutdruckregistrierung durch Hg Manometer. 1 = Adrenalin 2 γ/kg, 2 = Beginn Histamin-Dauerinfusion 100 γ/kg/min, 3 = 2 mg/kg Ephedrin, 4 = 2 mg/kg W 45. Zeit in Minuten.

Gleichwertig waren beide Substanzen beim narkotischen Kollaps, der durch Barbiturate hervorgerufen war, allerdings mit der Einschränkung, daß eine Nachinjektion von Ephedrin im allgemeinen keinen günstigen Einfluß mehr hatte. Das ging aus Versuchen an Katzen und Meerschweinchen hervor. Avertin dagegen hemmte eindeutig stärker die Kreislaufwirkung des Ephedrins als die des W 45.

An dem durch Ca-Minderung in der Nährlösung geschädigten Froschherzen hat W 45 in einer Konzentration von 1:100000 eine etwa dem Ephedrin und Coffein vergleichbare positive inotrope Wirkung. Am Herz-Lungen-Präparat der Ratte nach der Methode von S. Begovic u. P. Stern, sowie v. Haxthausen konnten wir diese Befunde bestätigen. Im Gegensatz zum Ephredin und anderer Verbindungen der Adrenalin-Ephedrin-Reihe hat W 45 keine positive chronotrope Wirkung.

Am Ganztier Hund, Katze, Ratte führten Dosen von 1—3 mg/kg regelmäßig zu einer etwa 30—40 min anhaltenden Bradykardie.

Die für das 2-AP geschilderte analeptische Wirkung ist der Verbindung W 45 noch in höherem Grade zu eigen. Der durch Avertin-Dauerinfusion provozierte Atmungsstillstand läßt sich mit Dosen von 5 bis 10 mg/kg aufhalten oder beheben. Bei der Barbiturat-Vergiftung hatte W 45 ebenfalls eine gute Wirkung, sie war etwas besser als die des Pente-

trazols in 4—5fach höherer Dosis. An Kaninchen ließ sich die durch 100 mg/kg Morphin hervorgerufene Lähmung der Atmung mit 2—3mg/kg W 45 durchbrechen. Die Atmungsfrequenz stieg auf 70% des Ausgangswertes vor der Morphinzugabe; dieser Wert wurde über 90 min und länger beibehalten. An Mäusen und Ratten konnten wir die bei Katzen und Kaninchen erhobenen Befunde bestätigen. Nach der oben angegebenen Methode wurden ihnen steigende, über die sicher tödliche Dosis hinausgehende Dosen Avertin oder Evipan injiziert.

| | W 45 | | | | Pentetrazol | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| I Versuche mit weißen Ratten. Avertin | 80 | 3 | 12 | 10 | 5 | 12 | 6 |
| | 90 | 4 | 12 | 9 | 6 | 12 | 5 |
| II A Versuche mit weißen Mäusen. Avertin | 50 | 5 | 11 | 10 | 5 | 11 | 11 |
| | 60 | 5 | 11 | 9 | 5 | 11 | 9 |
| | 70 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 |
| | 80 | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 | 5 |
| | 90 | 6 | 6 | 5 | 7 | 6 | 2 |
| | 100 | 7 | 6 | 5 | 8 | 6 | 2 |
| | 110 | 7 | 6 | 3 | 8 | 6 | 1 |
| II B Versuche mit weißen Mäusen. Evipan Na | 40 | 5 | 10 | 9 | 5 | 10 | 10 |
| | 50 | 5 | 10 | 10 | 5 | 10 | 9 |
| | 60 | 5 | 10 | 9 | 6 | 10 | 8 |
| | 70 | 6 | 10 | 9 | 6 | 10 | 8 |
| | 80 | 6 | 9 | 8 | 7 | 9 | 8 |
| | 90 | 6 | 9 | 6 | 7 | 9 | 3 |
| | 100 | 7 | 9 | 1 | 8 | 9 | 2 |

1 = Dosis Narkoticum mg/100 g Tier, 2 = Dosis Analepticum mg/100 g Tier, 3 = Zahl der Versuchstiere, 4 = Zahl der überlebenden Tiere.

Eine spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur war deutlich vorhanden. Am Darm i. s. der Katze sahen wir eine Tonussenkung und Hemmung der Peristaltik für etwa 15 min. Am is. Darm fanden wir folgende Hemmwerte:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Histamin | 1:10 Mill. | W 45 1:1 Mill. | 25% Hemmung[1] |
| Doryl | 1:10 Mill. | W 45 1:1 Mill. | 15% Hemmung |
| $BaCl_2$ | 1:50000. | W 45 1:1 Mill. | 20% Hemmung |

Der experimentelle Bronchospasmus an Katzen und Meerschweinchen wurde nur schwach gelöst, Ephedrin hatte da eine bessere Wirkung.

An Mäusen fanden wir unverkennbar sedative Wirkungen bei einer Dosis von 0,2 mg/10 g Maus s. c. Bei Ratten und Hunden waren die Effekte nicht eindeutig. Eine sedative Wirkung war bei Ratten nicht festzustellen.

Resorptionsversuche ergaben, daß eine p. o. Applikation von 10—20 mg/kg bei der Katze in Narkose ohne Wirkung blieb. Wurden dagegen 2—3 mg/kg in den Darm injiziert, so folgte eine unverkennbare Blutdrucksteigerung. Voraussetzung

[1] 100% = max. Kontraktion des Darmes.

war dabei, daß der Darm nach der Operation wieder seine normale Peristaltik zeigte. A. Enders berichtete über ähnliche Befunde mit Veritol und Sympatol. — 40 mg/100 g W 45 in 1 $cm^3$ Flüssigkeit hatten bei der Ratte keine toxischen Erscheinungen zur Folge, wogegen 35 mg/100 g in 5 $cm^3$ Flüssigkeit bei 50% den Tod unter typischen Erscheinungen bewirkten. Kontrolluntersuchungen mit Bariumbrei ergaben, daß die Magenentleerung deutlich verzögert war.

## Zusammenfassung.

Die Wirkungen der Amino-Pyridine und des 4-Methyl-2-Amino-Pyridins werden beschrieben. Diese sind: positive inotrope Herzwirkung, periphere Vasokonstriktion, Anregung der Atmung, Spasmolyse der glatten Muskulatur in Darm und Bronchien, zentrale Wirkung sedativen Charakters. Es handelt sich hier um eine Verbindungsgruppe mit sympathicomimetischer Wirkung.

## Literatur.

Begovic, S., u. P. Stern: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 333 (1953). — Dingemanse, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **132**, 363 (1928). — Dittmar, H. A., K. Mechelke u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 75 (1954). — Dohrn, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **105**, X. (1924). — Enders, A.: Arzneimittel-Forsch. **1**, 288 (1951). — Forst, A. W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 288 (1938). — Frank, O., u. J. Petter: Z. Biol. **54**, 18 (1910). — v. Haxthausen, E.: Arzneimittel-Forsch. im Druck. — Junkmann, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **105**, 169 (1925). — Kallos, P., u. W. Pagel: Arch med. Scand. **91**, 292 (1937) Zit. nach L. Ther: Pharmakol. Methoden. — Kochmann, M., u. H. Kunz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 421 (1936). — Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — Magnus, R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904). — Riechert, W., u. H. Schneider: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 121 (1941). — Schäfer u. A. Oberdorf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (in Vorbereitung). — Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 109 (1940). — Shaw, F. H., u. G. Bentley: Nature (Lond.) **169**, 712 (1952), Zit. n. Ber. Physiol. **157**, 77 (1953). — Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **81**, 55 (1917). — Trevan, I. W.: Proc. Roy. Soc. Lond. **101**, 483 (1927), Zit. n. L. Ther: Pharmakol. Methoden.

Dr. Elmar Frhr. v. Haxthausen in Chem. Fabrik Dr. F. Raschig GmbH, Ludwigshafen/Rhein.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 172—179 (1955).

Aus der Pharmakologischen Abteilung der Nordmark-Werke GmbH. Hamburg, Werk Uetersen/Holstein.

# Die Wirkung von Anticonvulsiva auf das Rückenmark.

Von

GÜNTHER STILLE.

Mit 6 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 18. März 1955.)*

Die folgenden Untersuchungen sind der Frage gewidmet, wieweit die krampfhemmende Wirkung von Diphenylhydantoin (DH)[1] und Phenyläthylbarbitursäure (PB) mit einer Wirkung auf die Interneuronen einhergeht oder sogar ursächlich verknüpft ist. Zur Klärung dieser Frage bedienten wir uns der Reflexerregbarkeit des Rückenmarkes und hier insbesondere der polysynaptischen Reflexe und der Facilitation des monosynaptischen Reflexablaufes. Unseres Wissens liegen hierzu noch keine Untersuchungen vor bis auf eine im anderen Rahmen niedergelegte kurze Bemerkung von VAN HARREVELD, FOSTER u. FASMAN, daß DH nur eine geringe Wirkung auf die Reflexaktivität des Rückenmarkes habe.

## Methode.

Bei der Durchführung der Reflexversuche bedienten wir uns im wesentlichen der von TAUGNER u. CULP beschriebenen Versuchsanordnung. Insgesamt wurden 27 Katzen im Gewicht von 3—5 kg verwendet. Im allgemeinen wurde den Tieren am Vorabend das Rückenmark in Höhe der unteren Thorakalsegmente in Äthernarkose durchtrennt. Am Versuchstage wurde die Mehrzahl der Tiere unter Äther nach SHERRINGTON decerebriert (zwischen oberen und unteren 4 Hügeln). Die Blutdruckmessung erfolgte in der A. carotis communis, und zwar, um Blutungen aus der Gehirnwunde infolge Heparinisierung zu vermeiden, mit Hilfe der TRENDELENBURGschen Gegenstromapparatur. Die Injektion bzw. Infusion der Versuchslösungen erfolgten in die V. jugularis externa oder in die V. femoralis. Zur Dauerinfusion bedienten wir uns der von BRAUN, MELSUNGEN, entwickelten Infusionspumpe.

Wir registrierten mit Hilfe des von KOLL modifizierten KEITH-LUCAS-Hebels auf einem Rußkymographion den homolateralen Beugereflex, den kontralateralen Streckreflex, den Patellarsehnenreflex (PSR) und die Facilitation des PSR. Die Fixierung des Tieres wurde wie bei TAUGNER u. CULP vorgenommen.

Die Reflexauslösung erfolgte durch Reizung der zentralen Stümpfe der Nn. tibialis und fibularis mit nach außen isolierten Platinelektroden und dem Rechteck-Reizgenerator „Stimulator". Die Reizparameter betrugen im allgemeinen 50 H, 4 msec, 4 mA alle 2 min für 2 sec. Außerdem wurde durch einen automatisch arbeitenden Reflexhammer alle 5 sec der PSR ausgelöst.

[1] Verwendet wurde Zentropil (Nordmark-Werke).

Die Durchtrennung der Nerven an den Hinterbeinen geschah wie bei Taugner u. Culp.

Sowohl DH als auch PB wurden in 1%iger Lösung als Natriumsalze verabreicht. Entsprechende Alkalilösungen mit gleichem $p_H$ wurden im Leerversuch zum

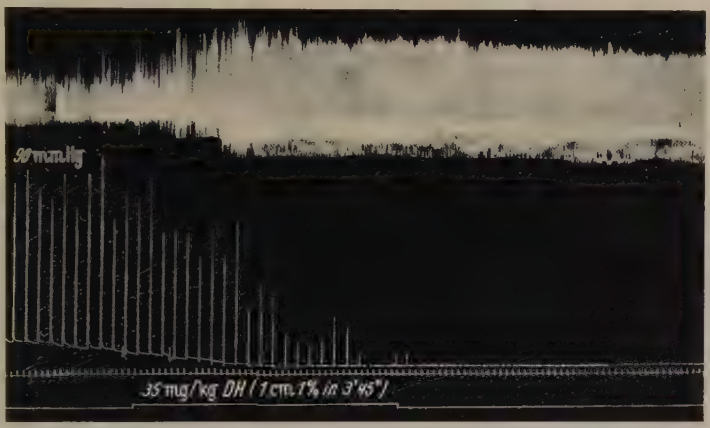



Abb. 1. Katze: 3100 g; Rückenmark durchtrennt, decerebriert. Oben: Patellarsehnenreflex links. Unten: Homolateraler Beugereflex rechts. ↑↓ 35 mg/kg Diphenylhydantoin. Zeitschreibung: 1 min.

Abb. 2. Katze: 4200 g; Rückenmark durchtrennt, decerebriert. Oben: Patellarsehnenreflex links. Unten: Homolateraler Beugereflex rechts. ↑↓ 60 mg/kg Phenyläthylbarbitursäure. Zeitschreibung: 1 min.

Vergleich herangezogen und waren in den vorliegenden Versuchsanordnungen wirkungslos. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug für alle Lösungen 1 $cm^3$ in 3 min 40 sec.

Es wurden nur Tiere verwendet, deren mittlerer Blutdruck nach beendeter Operation über 70 mm Hg lag. Die Körpertemperatur wurde durch Heizkissen konstant gehalten.

*Verhalten der polysynaptischen Reflexe.*

Sowohl DH als auch PB setzen die Reflexerregbarkeit des homolateralen Beuge- und des kontralateralen Streckreflexes herab.

Es kommt während der Infusion zu einem langsamen, kontinuierlichen Absinken der Reflexhöhe bis zum völligen Verschwinden. Die Dosis, die zu einem Abfall der Ausgangsreflexhöhe des Beugereflexes um 75% führt, beträgt im Mittelwert für DH 31,9 mg/kg ± 3,67 (14 Katzen) und für PB 24,5 mg/kg ± 3,22 (6 Katzen). In keinem Fall

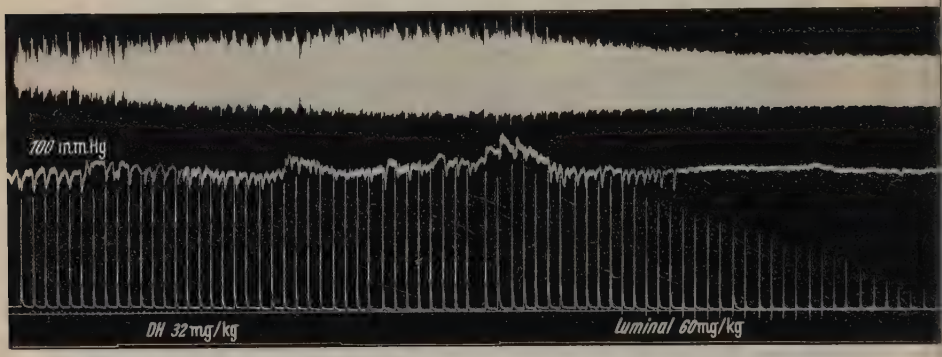



Abb. 3. Katze: 3200 g; Rückenmark durchtrennt, decerebriert. Oben: Patellarsehnenreflex links. Mitte: Arterieller Blutdruck. Unten: Homolateraler Beugereflex rechts. ↑↓ 1. 32 mg/kg Diphenylhydantoin. ↑↓ 2. 60 mg/kg Phenyläthylbarbitursäure. Zeitschreibung: 1 min.

kommt es in der im allgemeinen über 2—3 Std gehenden Nachbeobachtungszeit zu einem spontanen Wiederauftreten des Reflexes.

Im Gegensatz zum PB beobachtet man beim DH gelegentlich nach Beginn der Infusion einen vorübergehenden Anstieg der Reflexhöhe. Bei 2 Tieren sahen wir nach DH keine Abnahme der Reflexausschläge, sondern erst nach anschließender Infusion von PB (Abb. 3).

Gegenüber der Weckwirkung von Krampfgiften verhält sich die Wirkung von PB einerseits und DH andererseits verschieden, obwohl eine gleichmäßige Wirkungstiefe anzunehmen war, da in unseren Versuchen in allen Fällen das Pharmakon gleichmäßig, bis zum völligen oder fast völligen Aussetzen der Reflexaktion infundiert worden ist. Die PB-Wirkung wird durch Metrazol (bis 25 mg/kg in 5 Einzelgaben im Abstand von 5 min) und Strychnin (bis zu 25 $\gamma$/kg in 5 Einzelgaben im Abstand von 5 min) jeweils allein gar nicht oder nur unbedeutend beeinflußt, während bei aufeinanderfolgender Gabe beider Krampfgifte zum Teil sogar eine volle Reflexerregbarkeit wieder erreicht werden kann (Abb. 4). Gleichgültig hierbei ist, ob Metrazol oder Strychnin als erstes verabreicht wird.

Demgegenüber ist die Reflexerregbarkeit nach DH wesentlich schwerer erweckbar. Nur bei 2 von 9 Katzen ließ sich die DH-Wirkung aufheben, und zwar in einem Fall nach 5 × 5 $\gamma$ Strychnin/kg in 5minütigen Abständen, beim zweiten Tier sowohl nach Metrazol (4 × 5 kg/mg) als auch nach Strychnin (5 $\gamma$/kg).

*Verhalten der monosynaptischen Reflexe.*

Der PSR als monosynaptischer Reflex zeigt gegenüber DH und PB ein abweichendes Verhalten. Wir beobachteten bei PB in jedem Fall eine Abnahme der Reflexhöhe (Abb. 2), wobei die Hemmwirkung auf den monosynaptischen Reflexbogen im allgemeinen erst bei einer höheren Dosis auftritt als die auf die Multineuronreflexe. Im Gegensatz hierzu ist die Wirkung von DH auf den PSR uneinheitlich. Von 8 ohne Narkose untersuchten decerebrierten und myelotomierten Tieren zeigten 6 nach

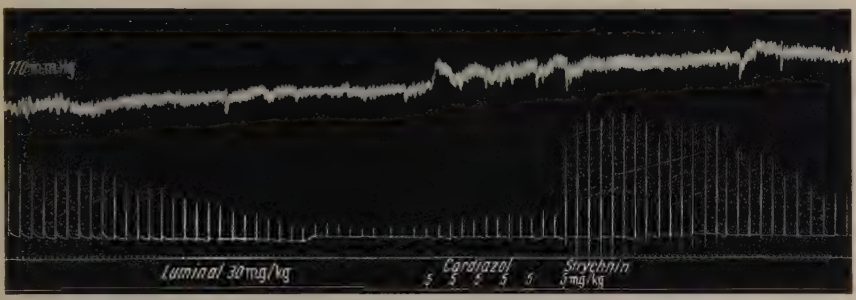



Abb. 4. Katze: 4800 g; Rückenmark durchtrennt, decerebriert. Oben: Blutdruck. Unten: Homolateraler Beugereflex rechts. ↑ 30 mg/kg Phenyläthylbarbitursäure. ↓ 5 × 5 mg/kg Metrazol im Abstand von 5 min. ↧ 5 γ/kg Strychnin. Zeitschreibung: 1 min.

DH einen deutlichen, zum Teil starken Anstieg der Hubhöhe beim PSR (Abb. 1 u. 3).

Nur 2 Katzen wiesen unter der Infusion eine geringe Abnahme der Hubhöhe auf. Demgegenüber zeigten 4 von 5 Katzen unter Chloralose-Urethannarkose mit intaktem Rückenmark eine deutlich ausgeprägte Abnahme der Reflexstärke (Abb. 5 u. 6).

Besonders auffällig war bei allen Tieren eine zunehmende Gleichmäßigkeit der Reflexausschläge unter der Infusion (Abb. 5 u. 6).

*Verhalten des Begünstigungseffektes.*

Bei 8 Tieren beobachteten wir bei Reizung des kontralateralen N. ischiadicus bzw. N. fibularis eine deutliche Vergrößerung der Hubhöhe des PSR (Facilitation) (Abb. 1, 2, 3, 5 u. 6). In allen Fällen kommt es unter der Infusion von DH zu einem Geringerwerden oder völligen Schwinden dieses Begünstigungseffektes. Besonders deutlich ist dies bei den Tieren, bei denen unter DH ein Absinken der Hubhöhe des Reflexes zu beobachten ist (Abb. 5). Schwerer deutbar ist das Nachlassen der Facilitation bei Steigerung des Reflexausschlages, da hier durch die Vergrößerung des Hubes möglicherweise eine ungünstige Ausgangslage für eine zusätzliche Facilitation geschaffen wurde.

Bei Betrachtung der Abb. 6 fällt auf, daß sich nach der Behandlung des Tieres auch die Form der Begünstigungszacken verändert. Während diese zunächst ungleichmäßig in der Höhe des Einzelausschlages er-

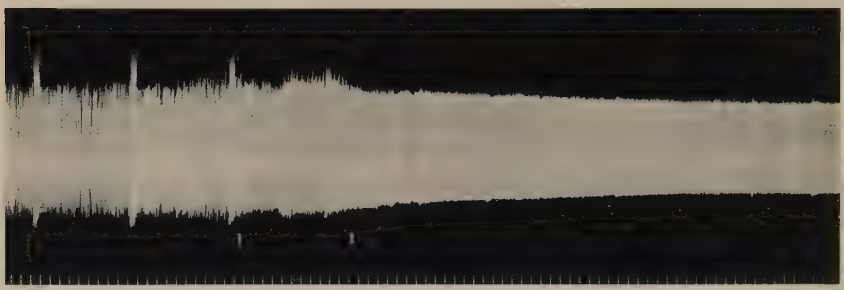


Abb. 5. Katze: 3000 g, Narkose: Chloralose-Urethan. Patellarsehnenreflex, Facilitation durch Reizung des kontralateralen N. fibularis (herausragende Spitzen der Kurve). ↑↓ 40 mg/kg Diphenylhydantoin.

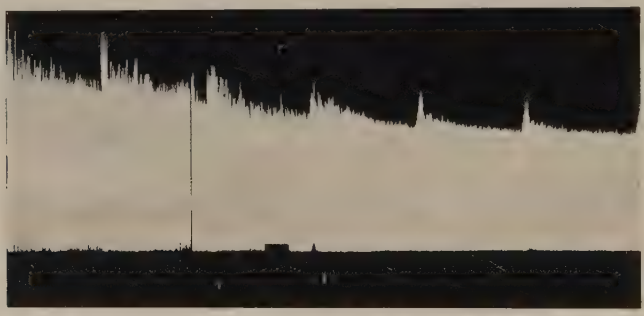


Abb. 6. Katze: 4000 g. Narkose: Chloralose-Urethan, Patellarsehnenreflex, Facilitation durch Reizung des kontralateralen N. fibularis (wie in Abb. 5). ↑↓ 40 mg/kg Diphenylhydantoin.

scheinen und die Begünstigungswirkung nur langsam nachläßt, wird unter der Wirkung von DH der Ausschlag gleichmäßiger und der Begünstigungseffekt klingt schneller ab.

## Diskussion.

Nach den vorliegenden Beobachtungen sind DH und PB echte Interneuronengifte, denn es handelt sich beim homolateralen Beuge- und beim kontralateralen Streckreflex um Reflexe mit ein oder mehreren Zwischenneuronen. Wieweit diese Wirkung von DH und PB für den antikonvulsiven Effekt von Bedeutung ist, kann zwar zunächst nicht mit Sicherheit entschieden werden. Es ist jedoch bemerkenswert, daß die antikonvulsive und interneuronenblockierende Dosis weitgehend übereinstimmt. Wir beziehen uns dabei auf die klassischen Versuche von Merritt u. Putnam an der Katze, die sowohl für DH als auch für PB

eine antikonvulsive Dosis von 20 mg/kg intraperitoneal ergaben. Für langsame intravenöse Infusion liegt nach unseren Versuchen die interneuronenblockierende Dosis der beiden Stoffe bei 32 bzw. 25 mg/kg.

Berücksichtigt man den relativ langsamen Eintritt der vollen Wirkung der genannten Stoffe (nach Merritt u. Putnam volle Krampfschutzwirkung erst nach 2 Std), so ist nicht verwunderlich, daß unsere Werte etwas höher liegen, wird doch bei unserer Infusionsmethode möglicherweise mehr infundiert als zum Eintritt der vollen Wirkung bei noch langsamerem Zustrom erforderlich wäre.

Der Fortfall der Begünstigungswirkung (Facilitation) ist ebenfalls der Interneuronenwirkung der geprüften Pharmaka zuzuschreiben. Es handelt sich bei der Facilitation um die Erregung vielsynaptischer Interneuronensysteme, deren Erregungslage entweder hemmend oder fördernd auf Reflexe wirkt, Systeme, die sich vom Hirnstamm bis in die caudalen Rückenmarkssegmente hinabziehen (Formatio bzw. Substantia reticularis: Magoun u. Rhines, French, Amerongen u. Magoun, Rhines u. Magoun). Die tonusgebende, hemmende oder fördernde Wirkung dieses Systems geht in seiner Bedeutung aber weit über die Wirksamkeit auf einzelne Reflexe hinaus und bestimmt die Erregungslage des gesamten ZNS. Da die Organisation dieses Systems offenbar einheitlich ist, dürften DH und PB auch auf die aus technischen Gründen nicht untersuchten höheren Anteile wirksam sein.

Bemerkenswert ist beim Begünstigungseffekt unter der DH-Wirkung, daß der bei geringen Dosen noch vorhandene Reizeffekt schneller abklingt, offenbar also die im Netzwerk der Synapsen kreisenden Erregungswellen rascher gedämpft werden.

Im Zusammenhang mit dem Reticulärsystem sei noch darauf hingewiesen, daß Starre, Tremor und andere extrapyramidale Erscheinungen nach Verabreichen toxischer Dosen DH auftreten. Das Vergiftungsbild (60 mg/kg als Infusion) ähnelt sehr den Enthirnungserscheinungen und dürfte unseres Erachtens auf eine elektive Hemmung bestimmter Aresale der Formatio reticularis zurückgeführt werden. Die Erscheinungen sind auch bei der Thalamuskatze nachweisbar. Die Tatsache, daß es nach PB zu keinen derartigen Bildern kommt, dürfte darauf zurückzuführen sein, daß gleichzeitig andere Gebiete des ZNS gelähmt werden.

Für eine lähmende Wirkung der PB nicht nur auf die Interneuronen spricht auch die immer zu beobachtende hemmende Wirkung auf den monosynaptischen PSR. Die Verstärkung des monosynaptischen PSR nach DH dürfte wohl als „release"-Phänomen nach Blockierung der Interneuronen gedeutet werden.

Erdmann u. Schaefer beobachteten nach E 605 und Taverner nach Mephenesin eine Steigerung des monosynaptischen bei Lähmung des polysynaptischen Reflexes. Eine umgekehrte Wirkung liegt offenbar beim Nicotin vor; hierbei führen nach Taugner u. Culp kleine Dosen, die den PSR vermindern, zu einer Verbesserung der polysynaptischen Reflexe.

Für die Beobachtung, daß der PSR bei Chloralose- bzw. Chloralose-Urethannarkose im Gegensatz zum nichtnarkotisierten Tier unter DH schwächer wird, ergibt sich eine Erklärung aus den Versuchen von Harreveld, Foster u. Fasman. Die Autoren untersuchten, wieweit DH den narkotischen Effekt von Äther und Pentobarbital auf den Patellarsehnenreflex beeinflußt und fanden beim Äther eine eindeutige potenzierende Wirkung von DH, die sie einer depolarisierenden Grundwirkung zuschreiben, zumal DH auch die asphyktische Depolarisierung verstärkt. Offenbar kommt es unter Chloralosenarkose zu einer ähnlichen Potenzierung eines depolarisierenden Effektes wie beim Äther.

Es dürfte nach dem Gesagten doch sehr wahrscheinlich sein, daß die Wirkung von DH und PB auf den Krampfanfall, sei es im Experiment oder in der Klinik, eine Interneuronenwirkung ist.

In erster Linie wäre es demnach wohl die *intracerebrale Erregungsausbreitung* über Zwischenneurone, die durch die beiden Antikonvulsiva gehemmt würde und tatsächlich zeigten Fuhrmann, Ross u. Magun elektroencephalographisch im Tierversuch eine Hemmung der Ausbreitung der epileptischen Potentiale durch DH.

Auch die Ausbreitung von Erregungsvorgängen im *Pyramidensystem* dürfte zumindest teilweise über Interneurone erfolgen.

Bei der Katze ist z. B. das Pyramidenneuron mit dem spinalen Motoneuron ausschließlich durch einen „interneuron pool" verknüpft, während beim Affen (Macaca mulatta) zumindest ein Teil der Pyramidenfasern unmittelbar am spinalen Motoneuron endet (Cooper u. Denny-Brown, Hoff u. Hoff). Eine monosynaptische Übertragung ist von Bernhard, Bohm und Petersen unter bestimmten Reizbedingungen durch Latenzzeitmessungen wahrscheinlich gemacht. Diese Unterschiede dürften bei der Beurteilung von pharmakologischen Wirkungen am ZNS von größter Wichtigkeit sein.

Wieweit eine Wirkung von DH und PB auf das Polyneuronensystem der *Reticularsubstanzen* für die Krampfhemmung von Bedeutung ist, muß zunächst noch offen bleiben. Man muß aber wohl daran denken, daß die gerade für DH so bezeichnende Wirkung auf die tonische Krampfphase in den Reticulärsubstanzen des Hirnstammes lokalisiert ist. Es sei hier an die Untersuchungen von Tanaka u. Mishima erinnert, die nach Exstirpation des Gehirns bis auf den pontinen Teil des Hirnstammes noch den tonischen Streckkrampf im Elektroschock auslösen konnten und außerdem an diesem Präparat DH und PB noch als wirksam befunden haben.

Es wäre ferner denkbar, daß auch die unter DH zu beobachtende Verstärkung der klonischen Krämpfe im Elektroschockversuch die Folge einer Lähmung von reticulären Systemen ist, die zur Enthemmung höherer nervöser Vorgänge führt. Es sei hier erinnert an das Auftreten von Krampfpotentialen nach geringen Dosen von Barbituraten (Schütz u. Caspers).

In diesem Zusammenhang ist sehr bemerkenswert, daß zumindest dem PB nach Untersuchungen von Schütz u. Carpers jede Wirkung auf die *Krampfbildung* im Gehirn fehlt. Ja, sogar durch diesen Stoff die Krampfschwelle der Rinde, gemessen am Auftreten von Krampfpotentialen im EEG, herabgesetzt wird. Es ist also beim PB so, daß eine zentrale Erregbarkeitssteigerung durch gleichzeitige Synapsenblockade peripher als Erregbarkeitsverminderung, z. B. im Elektroschockversuch imponiert. Auch diese corticale Erregbarkeitssteigerung ist nach Schütz u. Caspers als Hemmung reticulärer Stammhirnsysteme durch PB zu deuten. Entsprechende Untersuchungen liegen unseres Wissens für das DH nicht vor.

Der grundsätzliche Unterschied im Wirkungsbild zwischen DH und PB dürfte unseres Erachtens darin liegen, daß DH ausschließlich an Interneuronen angreift, während PB schon monosynaptische Schaltstellen lähmt.

## Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung von DH und PB auf monosynaptische und polysynaptische Rückenmarkreflexe an der Katze untersucht. Es zeigte sich bei DH eine lähmende Wirkung ausschließlich auf die polysynaptischen Reflexe, während PB auch den monosynaptischen Reflexablauf hemmt. Bemerkenswert ist ferner eine deutliche Wirkung von DH auf die „Facilitation" des PSR nach Reizung des kontralateralen N. ischiadicus. Es wird die Bedeutung dieser Befunde für die Erklärung des Wirkungsmechanismus von Antiepileptica diskutiert.

## Literatur.

Bernhard, C. G., E. Bohm u. J. Peterson: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 106, 79 (1953). — Cooper, S., and D. Denny-Brown: Proc. Roy. Soc. **100** B, 251 (1926); **102** B, 222 (1927). — Erdmann, W.-D., u. K. P. Schaefer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 519 (1954). — French, J. D., F. K. v. Amerongen u. H. W. Magoun: Arch. Neurol. Psychiat. **68**, 577 (1952). — Fuhrmann, W., G. Ross u. R. Magun: Dtsch. Z. Nervenheilk. **172**, 352 (1954). — Van Hareveld, A., R. J. Foster and J. D. Fasman: Amer. J. Physiol. **166**, 718 (1951). — Hoff, E. C., and H. G. Hoff: Brain **57**, 454 (1934). — Koll, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 365 (1937). — Magoun, H. W., and R. Rhines: J. of Neurophysiol. **6**, 165 (1946). — Merritt, H. H., u. T. J. Putnam: Arch. Neurol. Psychiat. **89**, 1003 (1938). — Rhines, R., and H. W. Magoun: J. of Neurophysiol. **9**, 219 (1946). — Schütz, E., u. H. Caspers: Z. inn. Med. **9**, 1037 (1954). — Tanaka, K., and O. Mishima: Jap. J. Pharmacol. **3**, 6 (1953). — Taugner, R., u. W. Culp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 423 (1953). — Taverner, D.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 655 (1952).

Dr. Günther Stille, Moorrege bei Uetersen/Holstein, Werftweg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 180—196 (1955).

Aus den Medizinischen Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel.

# Beurteilung der unspezifisch-toxischen Wirkungen von Arzneimitteln aus dem Knochenmark der Ratte.

Von

G. Zbinden und A. Studer.

Mit 10 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 18. März 1955.)*

Die Wirkungsweise chemischer Stoffe auf das aktive Knochenmark läßt sich durch verschiedene Mechanismen erklären. Neben der seit langem bekannten, spezifisch-toxischen Knochenmarksschädigung durch Benzol, Gold, Arsen usw. ist die Störung der Blutbildung durch zellteilungshemmende, radiomimetische Substanzen von größter Bedeutung geworden.

Von diesen wird das Knochenmark als mitoseaktivstes Organ am stärksten beeinflußt, womit der Chemotherapie der Leukämien und Tumoren Grenzen gesetzt sind (Heilmeyer, Bollag). Durch Antimetaboliten, z. B. Aminopterin, sind weitere Stoffe in die Medizin eingeführt worden, die durch Inaktivierung oder Verdrängung lebensnotwendiger Faktoren die Tätigkeit des Knochenmarks zu hemmen vermögen. Schließlich führen gewisse Arzneimittel unter besonderen Umständen auf dem Umwege der Antikörperbildung zu Zerstörung der im Blut kreisenden Leukocyten mit Erschöpfung des Knochenmarkes (Möschlin u. a.).

Diesen spezifisch auf die blutbildende Funktion des Knochenmarkes gerichteten Wirkungen möchten wir einen *unspezifischen* Effekt gegenüberstellen, der bei Überdosierung prinzipiell allen Medikamenten zukommt. Wir begegnen solchen Beeinflussungen des Knochenmarkes besonders bei der Prüfung von Medikamenten auf chronische Verträglichkeit bei fortgesetzter Verabreichung an Versuchstiere. Denn hierbei ist man genötigt, zur Erzeugung des gewünschten meßbaren Effektes auf Überlebenszeit und Körpergewicht das Vielfache der therapeutischen Dosen zu verabreichen. Eine solche Überschwemmung des Organismus auch mit gut verträglichen Stoffen führt zu histopathologisch faßbaren Veränderungen, durch die das absichtlich erzeugte chronische Vergiftungsbild näher charakterisiert wird. Dieses äußert sich vorwiegend in degenerativen Organveränderungen aller Art und ist meist weitgehend unabhängig von der chemischen Natur der verabreichten Medikamente. Man darf deshalb aus solchen experimentellen Ergebnissen nicht ohne weiteres auf eine analoge Wirkung nach therapeutischer Verwendung beim Menschen schließen. Dagegen sind durch Feststellung des

Schweregrades und des Ausmaßes toxischer Organschädigungen bei verschiedenen, gewichts- oder molgleich dosierten Arzneimitteln wertvolle Rückschlüsse auf die „allgemeine Verträglichkeit" der vergleichend geprüften Substanzen möglich.

Zweck dieser Arbeit ist, die histopathologisch erkennbaren unspezifischen Effekte chronisch verabreichter Medikamente auf das Knochenmark der Ratte darzustellen und mit der in andersartigen Versuchen festgestellten „allgemeinen Verträglichkeit" in Beziehung zu setzen. Dabei werden wir die Veränderungen der blutbildenden Zellen nur streifen und uns vorwiegend mit der Umgestaltung des Knochenmarksstromas befassen.

## Versuchsanordnung.

Gruppen von je 15—20 weißen Wistar-Ratten eigener Zucht von 35—45 g Gewicht werden mit einer vollwertigen „synthetischen" Diät folgender Zusammensetzung ernährt:

| | |
|---|---|
| Casein | 180 g |
| Glucose | 730 g |
| Salzmischung[1] | 40 g |
| Pura[2] (Cocosfett) | 30 g |
| Lebertran | 20 g |

Pro Tier und Tag werden folgende Vitaminmengen zusätzlich in der Blockschale verabreicht:

| | |
|---|---|
| Vitamin $B_1$ | 100 $\gamma$ |
| Vitamin $B_2$ | 200 $\gamma$ |
| Vitamin $B_6$ | 100 $\gamma$ |
| Nicotinsäureamid | 1 mg |
| Pantothensaures Calcium | 200 $\gamma$ |
| 2-Methyl-1,4-naphthochinon | 20 $\gamma$ |
| (+)-Biotin | 0,5 $\gamma$ |
| DL-$\alpha$-Tocopherol | 20 $\gamma$ |
| Cholin | 3 mg |

Nach einer Adaptionszeit von einigen Tagen wird das auf chronische Verträglichkeit zu prüfende Medikament den Tieren täglich in abgestuften Dosen mit der Schlundsonde, als Diätzusatz oder parenteral verabreicht. Aus der Überlebenszeit und der durchschnittlichen Gewichtszu- bzw. -abnahme, die sich immer als dosenabhängig erweisen, gewinnen wir erste, wertvolle Aufschlüsse über die chronisch-

[1] Zusammensetzung der Salzmischung:

| | |
|---|---|
| Natriumchlorid | 0,5 |
| Calciumlactat | 3,5 |
| Calciumphosphat | 1,5 |
| Eisencitrat | 0,321 |
| Kaliumjodid | 0,009 |
| Kupfersulfat | 0,003 |
| Magnesiumsulfat | 0,55 |
| Kaliumphosphat | 2,653 |
| Natriumphosphat | 0,96 |
| Zinkcarbonat | 0,002 |
| Mangansulfat | 0,002 |
| Natriumfluorid | 0,0003 |
| | 10,0003 |

[2] Walz und Eschle AG., Basel.

toxische Wirkung eines Medikamentes. Etwas vereinfachend werden wir im weiteren diese „allgemeine Verträglichkeit" durch die Überlebenszeit 50% (ÜLZ 50%) ausdrücken. Wir verstehen darunter die Anzahl Tage, während welcher ein Medikament einer Gruppe von Ratten verabreicht werden kann, bis 50% der eingesetzten Tiere gestorben sind. Bei einer ÜLZ 50% von mehr als 100 Tagen darf man die verabreichte Dosis als für Ratten sehr gut verträglich bezeichnen. Dagegen sind Dosen, die eine ÜLZ 50% von 1—10 Tagen ergeben als sehr toxisch, solche mit einer ÜLZ 50% von 11—30 Tagen als ziemlich toxisch und solche von 31—100 Tagen als leicht toxisch zu betrachten.

Nach Bestimmung der ÜLZ 50% an je 15—20 Ratten werden gleich zusammengesetzte Gruppen von Ratten nochmals mit dem Medikament behandelt. Diese Tiere werden in regelmäßigen Abständen getötet und histopathologisch untersucht. Blut- und Urinuntersuchungen werden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

Da, wie wir oben ausführten, die unspezifischen Reaktionen des Knochenmarkes bei Behandlung der Tiere mit verschiedenartigen chemischen Substanzen im Prinzip gleichartig verlaufen, begnügen wir uns damit, am Schlusse der Arbeit als Beispiel mehrere Derivate des Isonicotinsäurehydrazids (INH) herauszugreifen und die Beziehung zwischen „allgemeiner Verträglichkeit" dieser chemisch nahe verwandten Verbindungen und ihrer Wirkung auf das Knochenmarksstroma zu analysieren[1]. Als Vergleich dienten die Knochenmarksschnitte von normal[2] ernährten Ratten und von unbehandelten Tieren auf „synthetischer" Diät. Außerdem untersuchten wir die Veränderungen des Knochenmarksstromas von Ratten mit vollwertiger, aber unterdosierter, somit calorisch ungenügender Diät, mit eiweißarmer Diät und von Ratten, deren Knochenmark durch Verabreichung von N-Lost oder Succinylsulfathiazol (Spicer u. a., Jürgens u. Studer) spezifisch geschädigt wurde.

*Histopathologische Technik.* Töten der Ratten mit Chloroform. Der Femur wird 3 mm distal vom Hüftgelenk durchtrennt, von der anhaftenden Muskulatur befreit und im Gemisch von Susa fixiert. Die Knochen verbleiben in dieser Lösung

[1] In gleicher Weise wurden verschiedene Hypnotica, Anticonvulsiva und Antimycotica untersucht.

[2] Normalkost hat folgende Zusammensetzung:

| | |
|---|---|
| Cocosfett | 1,19% |
| Eisencitrat | 0,1 % |
| Fleischmehl | 9,4 % |
| Haferflocken | 21,0 % |
| Heumehl | 3,5 % |
| Kochsalz | 0,9 % |
| Magermilchpulver | 6,2 % |
| Mais gemahlen | 24,0 % |
| Mang. sulfuricum | 0,01% |
| Schmer | 2,4 % |
| Trockenhefe unbestrahlt | 9,0 % |
| Weizen gemahlen | 22,3 % |
| | 100,00% |

1 kg dieser Futtermischung wird in die 6fache Menge heißes Wasser eingerührt, aber nicht gekocht, und nach Erkalten den Tieren verfüttert.

2—3 Tage; sie sind dann weich und lassen sich nach dem Entsublimieren und Einbetten in Paraffin ohne weiteres schneiden. Die Struktur des Knochenmarks bleibt so viel besser erhalten als bei Verarbeitung des Markcylinders ohne Knochen. Die Präparate werden für die routinemäßige Untersuchung mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Außerdem verwenden wir die Bindegewebsfärbung nach VAN GIESON und die Silberimprägnation nach GOMORI.

## Ergebnisse.

Wir berichten im folgenden über die histopathologische Untersuchung des Knochenmarkes von 340 Ratten, die in der angegebenen Weise mit mittleren bis hohen Dosen verschiedener Medikamente behandelt wurden.

### *Bemerkungen zur Pathophysiologie des Knochenmarkes.*

Die unspezifische, toxische Wirkung von Arzneimitteln auf das aktive Knochenmark manifestiert sich in charakteristischer Weise in einer Umgestaltung des *Fettgewebes*, des *Gefäßsystems* und des *intercellulären Raumes*. Diese drei Elemente sind infolge der starren Begrenzung durch den Knochen so eng miteinander verbunden, daß sich jede Volumenveränderung des einen unmittelbar auf die beiden andern auswirkt. Funktionell erfüllt das Fettgewebe des Knochenmarks drei Hauptaufgaben: zunächst dient es als „Pufferorgan" für die ungehinderte Volumenzunahme des blutbildenden Gewebes (ROHR) oder auch, wie UNDRITZ es am Beispiel des Knochenmarkshämatoms zeigte, des intercellulären Raumes. Zweitens bildet es, dank seiner faserigen Verbindungen mit dem Capillarsystem (ORSÓS) und den Reticulumzellen (ROHR) den wesentlichsten Bestandteil des Knochenmarksgrundgerüsts. Eine dritte Funktion darf aber nicht vergessen werden: dank seiner Lage in einem sehr stark vascularisierten Gewebe ist das Fettgewebe des Knochenmarks im Gegensatz zu demjenigen des übrigen Körpers geradezu prädestiniert, als rasch verfügbare Reserve eines calorisch hochwertigen Nährstoffes zu dienen. Der Abtransport des Fettes aus dem aktiven Knochenmark vollzieht sich in Notfallsituationen denn auch mit bemerkenswerter Geschwindigkeit (ROHR). Mit Hilfe dieses Mechanismus läßt sich die unspezifische Wirkung von Pharmarka, die in mehr oder weniger toxischen Dosen fortgesetzt verabreicht werden, zwangslos erklären: die chronische Überbelastung mit einer körperfremden Substanz führt zu einer Störung der fermentativen Vorgänge, wodurch auch die Assimilierung von Nahrungsstoffen beeinträchtigt wird. Dies äußert sich schon sehr bald in einer Verlangsamung des Körperwachstums. Um dieser Notlage zu steuern, mobilisiert der Körper seine rasch verfügbaren Reserven, namentlich das Fett des Knochenmarkes, wobei der Schwund dieses Fettes um so schneller und vollständiger erfolgt, je schwerwiegender das innere Milieu durch die zugeführten Substanzen gestört wurde. *Aus dem Grad der Fettgewebsatrophie des Knochenmarkes, aus der Geschwindigkeit*

*mit der sie eintrat und aus den reaktiven Veränderungen, die sie auslöste, können wir somit direkt auf die allgemein-toxische Wirkung der chronisch verabreichten Substanzmengen schließen.* In manchen Fällen kann dies schon zue inemZeitpunkt geschehen, in welchem Untersuchungen mit größerem Aufwand, z. B. Bestimmung von Gewichts- und Absterbekurven an einemumfangreichen Tier-material, noch keine verwertbaren Ergebnisse zeitigen.

*Histopathologische Befunde.*

*a) Fettgewebe, Gefäßsystem, Intercellularraum.* Die Entwicklung der *Atrophie des Fettgewebes* im Knochenmark der Ratte unter dem Einfluß fortgesetzt verabreichter Arzneimittel läßt sich im histologischen Schnittpräparat gut verfolgen, wobei zwangslos drei Stadien unterschieden werden können:

Bei *Beginn der Schrumpfung* im „eben noch normalen" Knochenmark sind die Fettzellen nicht we-sentlich verkleinert und enthalten alle eine einzige, im Durchmesser 20—45 $\mu$ große Fettvacuole. Die Protoplasmahülle, bei der normalen Fettzelle fast unsichtbar, tritt deutlicher und oft wie „zerknittert" hervor. Oft sind kleine Anhäufungen von Protoplasma nachzuweisen. Der ursprünglich sichelförmige, an die Wand gedrückte Kern setzt sich bereits etwas von der Peripherie der Zelle ab und nimmt ovale oder nierenförmige Gestalt an (Abb. 1). Die Retikulinfibrillen umspinnen die Fettzellen in einem zarten und dichten Netz, die Capillaren sind kaum erweitert und der intercelluläre Raum ist unsichtbar.

Im *ersten Stadium der Atrophie* ist die einzige große Vacuole bei vielen Fettzellen durch blaßgefärbte Protoplasmabrücken unterteilt. Diese Zellen ergeben mit ihren 10—15 oft nicht mehr als 1—5 $\mu$ großen Vacuolen besonders im fettreichen Mark ein eigenartiges Bild (Abb. 2) und fallen auch im Markausstrich sofort auf (Rohr). Der Kern rückt mehr und mehr ins Innere der Zelle, rundet sich ab oder wird durch die vielen kleinen Vacuolen allseitig eingedellt. Sein ursprünglich fast unsichtbares Chromatingerüst wird locker und läßt oft mehrere Nucleolen erkennen. Bei Silberimprägnation zeigt sich noch keine wesentliche Umgestaltung des Retikulinfasergerüsts. Der durch Schwund des Fettgewebes freigewordene Platz wird durch die Capillaren eingenommen, die sich mächtig erweitern; das Knochenmark erscheint „kongestioniert". Nur bei sehr raschem Verschwinden des Fettes oder auch bei gleichzeitiger Rückbildung des blutbildenden Gewebes wird der freigewordene Raum nicht nur durch die erweiterten Gefäße, sondern auch durch ein intercelluläres Ödem ausgefüllt. Dieses Ödem enthält, wie dasjenige bei der gallertigen Fettmarksatrophie des Menschen (Askanazy), oft reichlich feinfädiges Fibrin (Abb. 5).

Die starke Capillarerweiterung erfolgt nicht in allen Abschnitten des atrophierenden Markes gleichmäßig: wie Abb. 6 zeigt, findet sich unter dem Endost eine 100—200 $\mu$ breite, meist deutlich abgesetzte Zone mit einer geringen Zahl von Capillaren, die zudem auch nie so stark erweitert sind wie diejenigen der medialen Markpartien. Deshalb ist die Fettgewebsatrophie hier immer von einem intercellulären Ödem begleitet, welches sich aber wegen des hohen Zellgehaltes dieser Region nicht selten der Beobachtung entzieht.

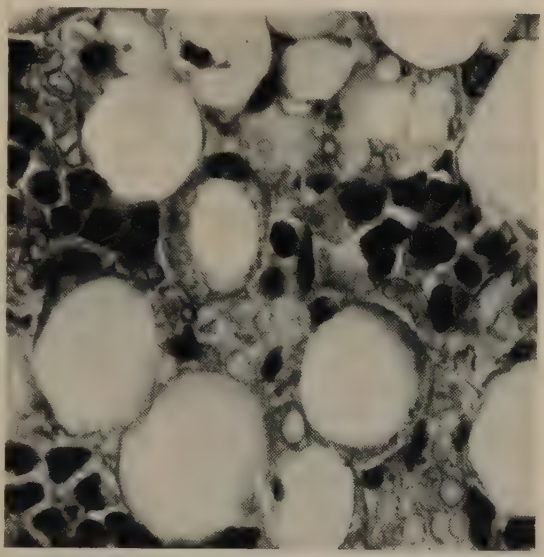


Abb. 1. Femurmark, Ratte. VAN GIESON. Vergrößerung 900fach. Beginnende Schrumpfung der Fettzellen. Abrundung der Kerne unter Loslösung von der Peripherie der Zelle.

Im *zweiten Stadium der Atrophie* sind die Vacuolen noch kleiner und zahlreicher, so daß die Fettzellen bei mittlerer Vergrößerung „granuliert“ erscheinen können (Abb. 3a). Viele Zellen sind jetzt dreieckig oder sternförmig und untereinander mit langen, zipfeligen Ausläufern verbunden. Die hellen, runden Kerne befinden sich durchwegs in der Mitte der Zellen. Das argyrophile Fasernetz ist oft zusammengesintert, die Retikulinfasern verlaufen gestreckt und gebündelt durch die zipfeligen Ausläufer in die Nachbarzellen oder strahlen in Capillarwandungen ein (Abb. 3b). Der Fasergehalt ist nur unwesentlich vermehrt. In der erwähnten Randzone unter dem Endost sind

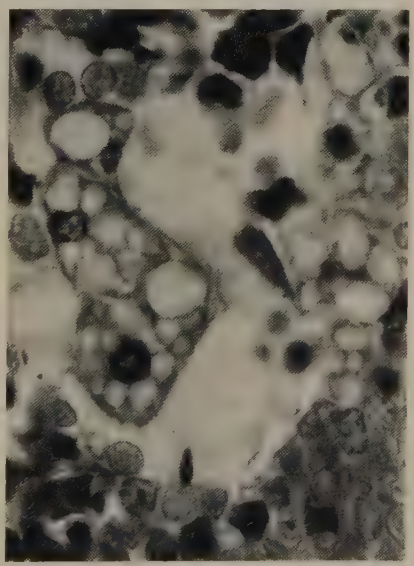


Abb. 2. Femurmark, Ratte. VAN GIESON. Vergrößerung 900fach. 1. Grad der Fettgewebsatrophie. Aufteilung der großen Vacuole in zahlreiche kleine. Kerne rund, aufgehellt und in die Zellmitte verlagert.

die Stromazellen stark ausgezogen, und ihre Kerne haben die längliche bis spindelige Form der Fibrocytenkerne an-genommen. Zwischen ihnen liegt ein blasses Ödem.

Im *dritten und schwersten Stadium der Atrophie* haben alle Fettzellen ihre Vacuole verloren und bilden ein Netz von sehr großen, mit Eosin leuchtend rot gefärbten, sternförmigen Zellen, die sich oft breit an Capillarwände anlagern. Die Kerne sind hell, hie und da bläschenförmig.

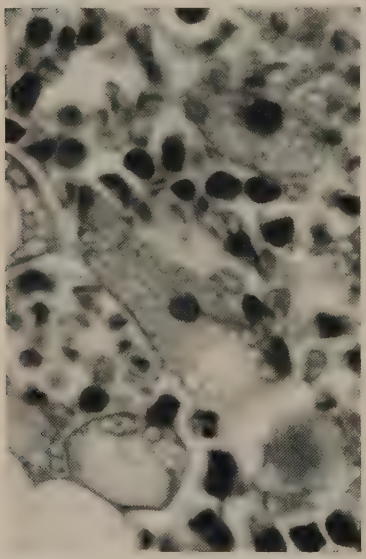


Abb. 3a. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 900fach. 2. Grad der Fettgewebsatrophie. Die Fettzelle verliert ihre rundliche Form, ihr Protoplasma enthält sehr viele kleinste Vacuolen.

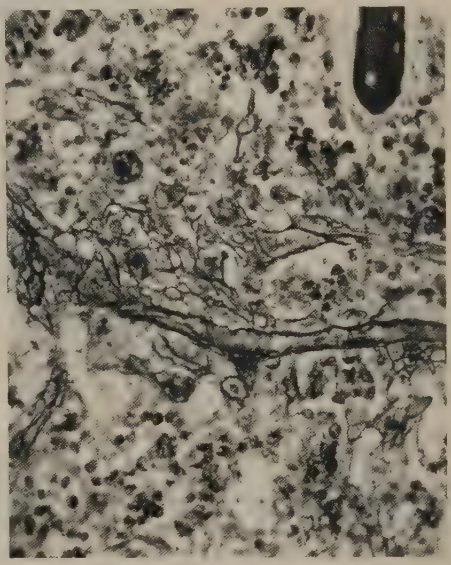


Abb. 3b. Femurmark, Ratte. Silberimprägnation nach Gomori. Vergrößerung 270fach. 2. Grad der Fettgewebsatrophie Das Fasergerüst der Fettzellen ist etwas zusammengesintert. Die Verbindung von Fettzellen mit einer Gefäßwand durch Retikulinfasern ist gut sichtbar.

Trotz mächtiger Erweiterung der sinusoiden Capillaren bleibt meist reichlich Raum für ein intercelluläres Ödem (Abb. 4). Die Retikulinfasern sind zu breiten Bündeln zusammengerückt und manchmal etwas vermehrt. — Eine ungewöhnlich starke Vermehrung solcher geschrumpfter Fettzellen oder Stromazellen (Undritz) im Femurmark der Ratte ist in Abb. 7 dargestellt: der größte Teil des Markraumes ist von den sehr großen, sternförmigen Zellen eingenommen, zwischen denen nur noch winzige Gruppen blutbildender Zellen zu sehen sind. Die Silberimprägnation ergibt eine außerordentlich starke Zunahme der präkollagenen Fasern (Abb. 7b). Wiederum fällt die Zone unmittelbar unter dem Endost auf: hier sind die Stromazellen noch kaum vermehrt, das blutbildende Gewebe ist noch reichlich erhalten (Abb. 7c). Ob es sich in diesem

Einzelfall um eine reaktive Wucherung der Stromazellen oder um eine hochgradige Atrophie eines ungewöhnlich fettreichen Markes handelt, wissen wir nicht. Die Seltenheit der Mitosen spricht mehr für die zweitgenannte Möglichkeit.

Wir haben die bei der Fettgewebsatrophie im Knochenmark der Ratte regelmäßig gefundene, starke *Capillarerweiterung* in Übereinstimmung mit Jolly bisher nur als Folge des durch den Fettschwund entstandenen Vakuums erklärt. Neben dieser passiven Gefäßerweiterung gibt es, wie Abb. 6 (Femurmark einer an schwerer Pneumonie erkrankten Kontrollratte) zeigt, auch eine aktive Markhyperämie. Gewiß werden in einzelnen Fällen auch die verabreichten Medikamente durch Gefäßlähmung eine Erweiterung der Capillaren hervorrufen, welche nun ihrerseits zu einer Druckzunahme in der Markhöhle führen und damit zum Schwund des Fettgewebes beitragen.

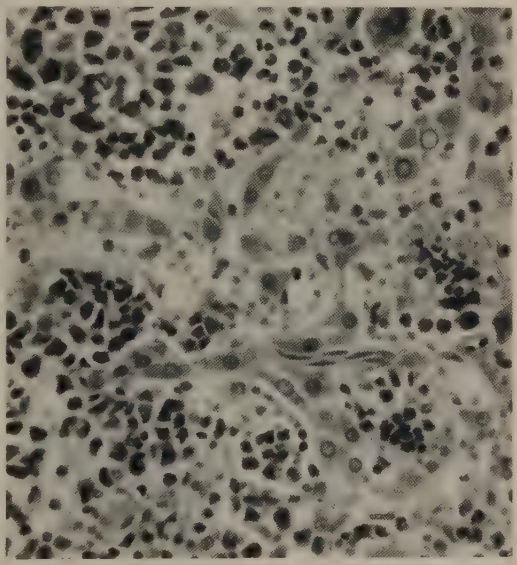


Abb. 4. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 400fach. 3. Grad der Fettgewebsatrophie. Die Fettzellen haben dreieckige bis sternförmige Gestalt angenommen und haben ihre Vacuolen verloren. Kerne hell, feinstrukturiert, hie und da bläschenförmig.

Der *Kreislauf im Knochenmark* ist nach den Ansichten der meisten Autoren geschlossen (Orsós, Rohr u. a.). Doch ist die Wand der Capillaren streckenweise sehr dünn und besteht in den „ungesicherten" (Orsós) Abschnitten lediglich aus einem Endothelschlauch. Es können deshalb schon recht geringe toxische Endothelschädigungen bei starker Hyperämie *diffuse Hämorrhagien* ins Knochenmark bewirken. Solche Blutungen können, wie Borst beobachtete, bei Ratten schon nach Fütterung einer fettarmen Diät vorkommen. Auch wir haben bei vereinzelten Kontrollratten, die sich aus irgendeinem Grunde schlecht entwickelten, kleine Markblutungen beobachtet. Häufiger trifft man diese Hämorrhagien aber nach chronischer Verabreichung hochdosierter Medikamente. Nach Tab. 1 besteht eine deutliche Beziehung zwischen der Verträglichkeit (ÜLZ 50%) eines Medikamentes in einer bestimmten Dosierung und der Häufigkeit des Auftretens von Knochenmarks-

blutungen. Wie durch den Nachweis einer Erythrocytenphagocytose durch Monocyten gezeigt werden kann (Abb. 8), sind die Blutungen intra vitam entstanden und nicht als Artefakte zu betrachten.

Nach 7 Behandlungstagen, in vielen Fällen jedoch schon früher, sind die unspezifischen histopathologischen Knochenmarksveränderungen ausgebildet. Ihr durchschnittlicher Entwicklungsgrad ist nach der doppelten ÜLZ 50% im allge-

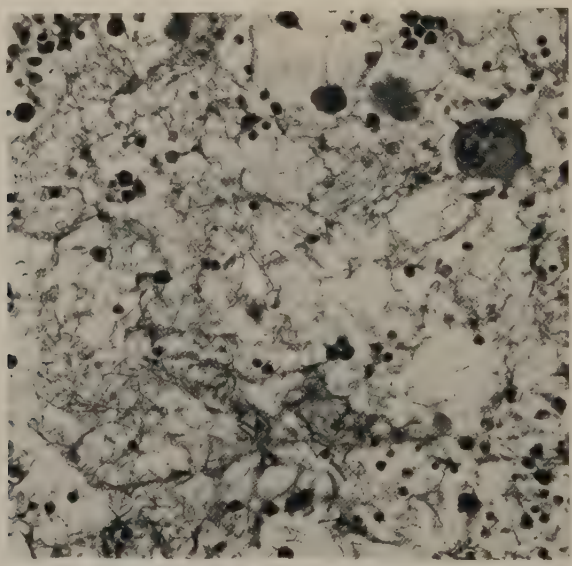


Abb. 5. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 350fach. Ausgedehnter Zellschwund nach Behandlung mit Succinylsulfathiazol. Fibrinreiches intercelluläres Ödem. Gleiche Veränderungen werden am calorisch unterernährten Tier beobachtet.

meinen nicht oder nur wenig schwerer als nach 1 Woche. Dies gilt selbst für sehr gut verträgliche Dosen, bei welchen sich sogar im Laufe der Wochen anfängliche Knochenmarksdegenerationen, die möglicherweise durch größere Empfindlichkeit der jungen Tiere bei Behandlungsbeginn bedingt waren, normalisieren können.

*Tabelle 1.*

| 50% der Tiere überlebend (ÜLZ 50%) nach Tagen | Anzahl der Tiere | Histopathologisch nachgewiesene Knochenmarksblutung | |
|---|---|---|---|
| | | Anzahl Tiere | % |
| bis 10 . . . . . | 17 | 12 | 70 |
| 11—30 . . . . . | 37 | 19 | 51 |
| 31—100 . . . . . | 48 | 7 | 15 |
| über 100 . . . . . | 134 | 8 | 6 |
| Kontr. „synth. Diät“ . . . | 54 | 2 | 4 |
| Kontr. Normalkost . . . . | 18 | 0 | 0 |

*b) Megakaryocyten.* Im Knochenmark der Ratte kommt es als Folge chronischer Intoxikationen häufig zu *Pyknosen der Megakaryocytenkerne.* Normalerweise sind diese Kerne im histopathologischen Schnittpräparat mehrfach gelappt, ziemlich hell und fein strukturiert. Durch toxische Einflüsse von Medikamenten, aber auch schon bei Hunger (Jolly), kommt es zu einer oft starken Verklumpung der Kerne, die sich dann sehr dunkel färben (Abb. 9a) und zuweilen auffallend stark segmentiert sind. Selbst Kernverflüssigung mit Aufsplitterung des Chromatins in zahlreiche Tropfen (Undritz) kommt gelegentlich vor. Hie und da sind die pyknotischen Kerne auch von einer großen, mit einer blaß gefärbten Flüssigkeit gefüllten Vacuole partiell oder ganz umschlossen. Manchmal wird der Kern von der Vacuole an die Peripherie der Zelle gedrängt (Abb. 9b). Die Häufigkeit der Kernpyknosen wechselt, doch können unter Umständen praktisch alle Megakaryocyten solche Veränderungen zeigen. Wie beim Schwund des Fettgewebes handelt es sich auch hier um einen unspezifischen Effekt der chronisch verabreichten Arzneimittel, deren chemische Zusammensetzung dabei nur eine geringe Rolle zu spielen scheint. In der Regel führen gut verträgliche Präparate selten, schlechter verträgliche häufiger zu den beschriebenen Kernveränderungen.

Abb. 6. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 100fach. An schwerer Pneumonie erkranktes Kontrolltier. Starke Hyperämie der medialen Markpartien, keine Gefäßerweiterung in subendostaler Randzone. *1* Knochen; *2* subendostale Randzone; *3* mächtig erweiterte Capillaren der medialen Markpartie.

Einige Worte noch zu der sogenannten *Pseudophagocytose* der Megakaryocyten. Darunter versteht man die in Schnittpräparaten recht oft zu beobachtende scheinbare Aufnahme von Knochenmarkszellen im Protoplasma der Megakaryocyten. Die Zellen befinden sich nach Undritz jedoch lediglich in Buchten des mächtigen Protoplasmaleibes, wo sie unter Umständen vollständig degenerieren können. Wir sahen aber in unserem Material verschiedene Knochenmarksschnitte von Ratten, in welchen die Pseudophagocytose ein ganz ungewöhnliches Maß erreicht: 16—25% der Megakaryocyten enthalten in ihrem Protoplasma fremde Zellen, wobei es sich in der überwiegenden Mehrzahl um segmentkernige, neutrophile Leukocyten

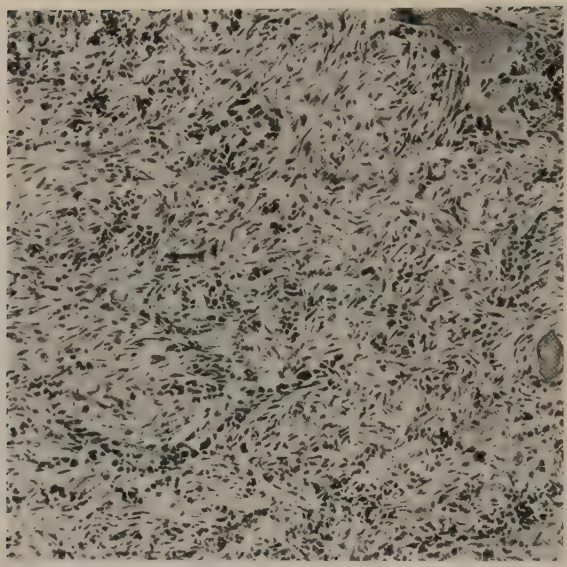


Abb. 7a. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 140fach. Extrem starke Vermehrung großer, sternförmiger Stromazellen (Markfibrose). Blutbildendes Gewebe nur noch in kleinen Herden vorhanden.

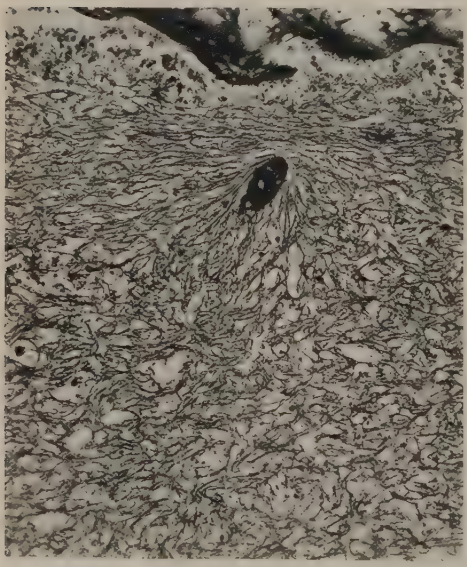


Abb. 7b. Femurmark, Ratte. Gleiches Tier wie Abb. 7a. Silberimprägnation nach Gomori. Vergrößerung 120fach. Sehr starke Vermehrung der Retikulinfasern.

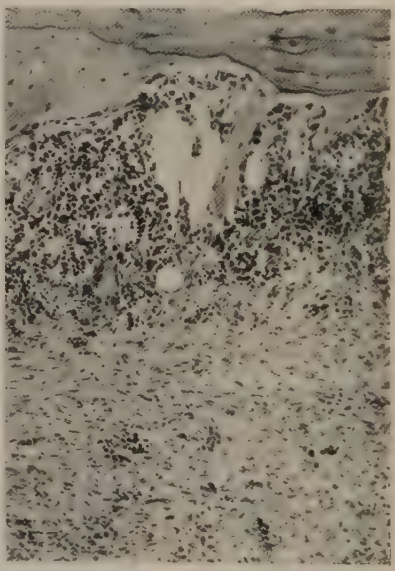


Abb. 7c. Femurmark, Ratte. Gleiches Tier wie Abb. 7a u. b. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 120fach. Trotz schwerster Markfibrose ist die Blutbildung in subendostaler Randzone erhalten.

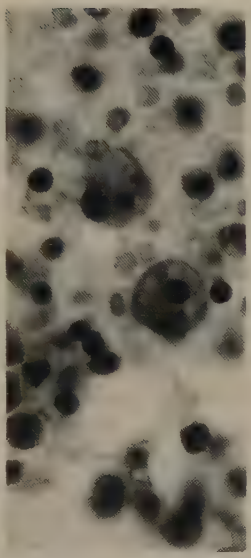


Abb. 8. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 900fach. Erythrocytenphagocytose durch Monocyten bei diffuser Markblutung.

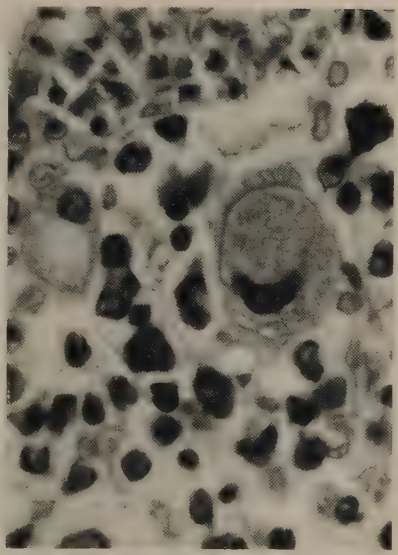


Abb. 9a. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 900fach. Megakaryocyt mit Kernpyknose. Links davon partiell atrophische Fettzelle.

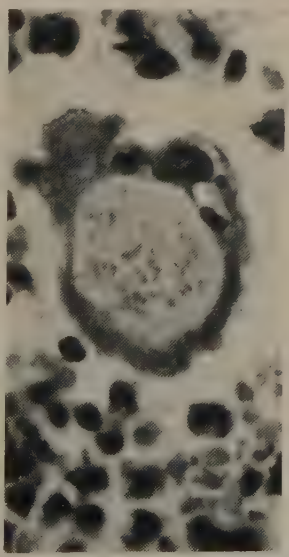


Abb. 9b. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 900fach. Megakaryocyt mit Kernpyknose und großer Vacuole.

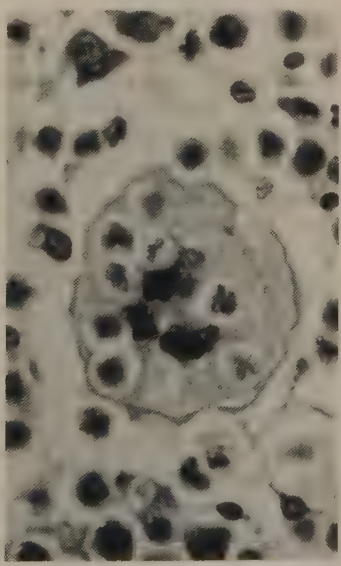


Abb. 10. Femurmark, Ratte. Hämalaun-Eosin. Vergrößerung 900fach. Pseudophagocytose eines Megakaryocyten. Im Protoplasma der Knochenmark-Riesenzellen sind mindestens 8 neutrophile Leukocyten erkennbar.

handelt. Nicht selten ist der Leib der Riesenzelle mit 7—10 neutrophilen Leukocyten vollgepfropft (Abb. 10), wodurch sich Bilder ergeben, die an die Neuronophagie des Zentralnervensystems erinnern. Der Gedanke, daß ein degenerierender Megakaryocyt durch chemotaktisch angelockte neutrophile Leukocyten abgebaut wird, liegt aus diesem Grunde nahe. — Eine Beziehung zwischen der „allgemeinen Verträglichkeit" des verabreichten Medikamentes und dem Auftreten solcher exzessiver Pseudophagocytosen hat sich bisher nicht ergeben.

*Beispiel: Chronische Verabreichung von Isonicotinsäurehydrazid (INH) und einiger seiner Derivate per os.* An diesem Beispiel soll die Abhängigkeit der vorstehend beschriebenen, histopathologischen Knochenmarksveränderungen von der allgemeinen Verträglichkeit einiger miteinander verwandter Präparate bei beträchtlicher Überdosierung dargestellt werden. Dem in abgestuften Dosen verabreichten IHN sollen verschiedene, ebenfalls antituberkulös wirksame Derivate gegenübergestellt werden.

Versuchsanordnung vgl. Seite 181. Den Ratten wurden folgende Substanzen und Dosen unter die „synthetische" Diät gemischt:

| Präparat | Chemische Bezeichnung | Dosierung mg/kg/Tag | | |
|---|---|---|---|---|
| | Isonicotinsäurehydrazid (INH) | 100 | 500 | 1000 |
| Ro 1-7641 | $N^1$-Isonicotinyl-$N^1$-isopropyl-hydrazin | | 500 | |
| Ro 1-7850 | $N^1$-(2-Methyl-isonicotinyl)-$N^2$-(acetylglycyl)-hydrazin | | 500 | |
| Ro 1-7829 | $N^1$-(2-Methyl-isonicotinyl)-$N^2$-(α-furyl-(2′)-äthyliden)-hydrazin | | 500 | |
| Ro 1-7531 | $N^1$-Isonicotinyl-$N^2$-(d,l-acetyl-methionyl)-hydrazin | | 500 | |
| Ro 1-7721 | $N^1$-Isonicotinyl-$N^2$-(acetyl-glycyl)-hydrazin | | 500 | |

Über die chemischen und biologischen Eigenschaften dieser Substanzen wird in anderem Zusammenhang berichtet (Fust, Straub, Böhni und Studer; Isler, Gutmann, Straub, Fust, Böhni und Studer). Als Vergleich dienen größere Gruppen von Kontrolltieren, die wie folgt ernährt wurden:

Kontrollen I: Normalkost (gemäß S. 182);
Kontrollen II: Vollwertige „synthetische" Diät (gemäß S. 181);
Kontrollen III: Vollwertige „synthetische" Diät mit Beschränkung der Calorienzufuhr;
Kontrollen IV: „Synthetische" Diät mit Reduktion des Eiweißes auf 4%.

Die für jedes Präparat, respektive jede Dosierung an 15—20 Ratten bestimmte ÜLZ 50% diente als Maß der „allgemeinen Verträglichkeit" der chronisch verabfolgten Substanz. In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Absterbeversuche zusammengestellt und mit den histopathologisch festgestellten Knochenmarksveränderungen verglichen, die mit denselben Präparaten in gleicher Dosierung in späteren Experimenten hervorgerufen wurden.

Aus der Zusammenstellung in Tab. 2 ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen der „allgemeinen Verträglichkeit" chronisch

verabfolgter Arzneimittel (ausgedrückt als ÜLZ 50%) und ihrer unspezifischen Auswirkungen auf das histopathologische Bild des Knochenmarkes.

Die Dosenabhängigkeit sowohl der Überlebenszeit chronisch behandelter Tiere, als auch der dabei auftretenden unspezifischen Knochenmarksveränderungen, geht aus dem Beispiel des INH hervor: mit 100 mg/kg/Tag starb während 310 Tagen kein Tier, unspezifische Knochenmarksveränderungen waren nur bei wenigen Ratten und lediglich in geringem Grade nachzuweisen. Mit 500 und besonders 1000 mg/kg starben die Versuchstiere viel früher, und entsprechend waren auch Markatrophie, Blutungen und Kernpyknosen der Megakaryocyten viel häufiger und viel ausgeprägter vorhanden.

Das Beispiel zeigt ferner, daß zur Differenzierung gutverträglicher Präparate im Tierexperiment Riesendosen verabfolgt werden müssen, welche für INH, bezogen auf das Körpergewicht, das Zwanzig- bis Zweihundertfache der therapeutisch gebräuchlichen Mengen betragen. Der Schwund des Knochenmarksfettes ist als empfindliches Zeichen einer chronisch-toxischen Schädigung des Organismus zu betrachten, welches selbst dann bis zu einem gewissen Grad nachweisbar bleibt, wenn aus Überlebenszeit (Tab. 2) und Gewichtszunahme keine Störung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere ersichtlich ist.

Knochenmarksblutung und Kernpyknosen der Megakaryocyten sind als gröbere Zeichen zu werten, die nur bei schwereren Vergiftungen bei einem größeren Prozentsatz der Versuchstiere auftreten. Selbst bei den auf „synthetischer" Diät gehaltenen Ratten der Kontrollgruppe II sind in einzelnen Fällen histopathologisch nachzuweisende Knochenmarksveränderungen aufgetreten. Auch im Wachstum bleiben diese Tiere gegenüber normal ernährten Ratten etwas zurück. Dies zeigt, daß die verwendete „synthetische" Diät der Normalkost nicht ganz ebenbürtig war.

Am Beispiel der calorisch und qualitativ unterernährten Ratten (Kontrollgruppen III und IV), deren Knochenmark analoge Veränderungen wie bei den medikamentös behandelten Tieren aufweist, sei die unspezifische Natur der Markatrophie und ihrer Folgen hervorgehoben.

## Diskussion der Ergebnisse.

Aus unseren Beobachtungen an einem recht großen Tiermaterial geht hervor, daß auch Arzneistoffe, die weder zu den eigentlichen Knochenmarksgiften, noch zu den Cytostaticis und Antimetaboliten gehören, bei chronischer Überdosierung zu morphologischen Veränderungen des Knochenmarkes führen. Zweifellos werden bei schwereren Markschädigungen auch Myelo- und Erythropoese in Mitleidenschaft gezogen (Paul u. Limarzi, Miller). So findet man gelegentlich Reifungsstörungen der myeloischen Knochenmarkselemente, die sich durch ihr sporadisches und unsystematisches Auftreten von den spezifischen Markschädigungen unterscheiden, hie und da sind die eosinophilen Zellen stark vermindert oder die reifen Leukocyten zeigen Kernverflüssigung. Auch der totale

*Tabelle 2.*

| Präparat | ÜLZ 50% Tage | Durchschn. Behandlungsdauer Tage | Anzahl der Tiere | Fettgewebe | | Fettgewebe atroph. | | | Blutung | Kernpyknose der Megakaryocyten[1] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | normal | beginnende Schrumpfung | 1. Grad | 2. Grad | 3. Grad | | 0 | + | ++ | +++ |
| Ro 1-7641 500 mg/kg | 4 | 16 | 7 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 | 0 |
| Ro 1-7850 500 mg/kg | 7 | 11 | 8 | 0 | 0 | 4 | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| INH 1000 mg/kg | 17 | 24 | 14 | 0 | 0 | 2 | 6 | 6 | 8 | 6 | 7 | 1 | 0 |
| Ro 1-7829 500 mg/kg | 32 | 15 | 11 | 0 | 3 | 5 | 2 | 1 | 4 | 4 | 6 | 1 | 0 |
| INH 500 mg/kg | 35 | 22 | 22 | 1 | 4 | 7 | 6 | 4 | 5 | 13 | 6 | 3 | 0 |
| Ro 1-7531 500 mg/kg | 61 | 28 | 7 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 1 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| Ro 1-7721 500 mg/kg | 114 | 45 | 13 | 3 | 4 | 4 | 1 | 1 | 1 | 10 | 3 | 0 | 0 |
| INH 100 mg/kg | 310 | 310 | 16 | 9 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 13 | 3 | 0 | 0 |
| Kontrolle I | — | — | 18 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 |
| Kontrolle II | — | — | 47 | 33 | 10 | 4 | 0 | 0 | 2 | 43 | 4 | 0 | 0 |
| Kontrolle III | — | 17 | 10 | 0 | 1 | 5 | 2 | 2 | 6 | 6 | 1 | 3 | 0 |
| Kontrolle IV | — | 20 | 11 | 4 | 5 | 2 | 0 | 0 | 3 | 7 | 4 | 0 | 0 |

[1] Pyknose der Megakaryocytenkerne: 0 keine; + bis etwa 30%; ++ bis etwa 60%; +++ über 60% aller Megakaryocyten mit deutlicher Kernpyknose.

Zellgehalt des Markes zeigt Schwankungen, bald im Sinne der Hyper-, bald der Hypoplasie; selbst die Leukocytenzahlen des peripheren Blutes können durch unspezifische Wirkungen von Arzneimitteln über die Grenzen der physiologischen Schwankungsbreiten hinaus beeinflußt werden. Diese Veränderungen des blutbildenden Gewebes treten aber erst bei sehr toxischen Dosen in wesentlicher Häufigkeit auf, so daß aus ihnen keine weittragenden Schlüsse gezogen werden dürfen. Sie spielen bei der Prüfung gut verträglicher Substanzen nur selten eine Rolle.

Man kann zur Beurteilung der Verträglichkeit fortgesetzt in großen Dosen verabreichter Arzneimittel die am Stroma des Knochenmarkes histopathologisch nachweisbaren Veränderungen als Spiegelbild des augenblicklichen Allgemeinzustandes des Versuchstieres auffassen (vgl. Beispiel S. 192). Die im Knochenmarksbefund zum Ausdruckkommende Entwicklungsstörung des Organismus infolge Schädigung der Fermentsysteme, Überbelastung der Ausscheidungsorgane usw. ist um so tiefgreifender, je toxischer die chronisch verabreichte Substanz auf das Tier wirkt. Es handelt sich somit um einen *unspezifischen* Effekt, der sich durch folgende Merkmale von der spezifischen Wirkung knochenmarksaktiver Substanzen unterscheidet:

1. Die unspezifische Wirkung auf das Knochenmark ist bei genügend hoher Dosierung im Prinzip mit allen Arzneimitteln — gut verträgliche eingeschlossen — zu erzielen, während die spezifisch markschädigenden Eigenschaften gewisser Substanzen an eine bestimmte chemische Struktur gebunden sind (Dameshek).

2. Spezifisch markschädigende Stoffe wirken in geringen Dosen, die außerhalb des Knochenmarkes noch keine wesentlichen Unverträglichkeitserscheinungen zu bewirken brauchen; dagegen ist der Effekt unspezifisch wirkender Stoffe immer von einer sichtbaren allgemeintoxischen Wirkung begleitet.

3. Sämtliche unspezifischen Knochenmarksveränderungen können auch als Folge einer nicht medikamentös bedingten Schädigung, z. B. qualitative und quantitative Mangelernährung, auftreten.

4. Die spezifische Markschädigung trifft in erster Linie und mit großer Regelmäßigkeit die blutbildenden Zellen, die unspezifische das Stroma. Der Leukocytenabfall im peripheren Blut ist daher bei spezifisch wirkenden Stoffen die Regel, bei unspezifisch wirkenden die Ausnahme.

Aus der Erkenntnis der unspezifischen Natur der beschriebenen Knochenmarksveränderungen folgt, daß es nicht angeht, aus der Wirkung eines fortgesetzt in großen Dosen verabreichten Arzneimittels auf das Knochenmark von Versuchstieren auf eine mögliche mark- oder blutschädigende Wirkung der Substanz bei therapeutischer Anwendung zu schließen. Insbesondere kann aus derartigen Experimenten über die Neigung eines Stoffes, bei gewissen Menschen durch Sensibilisierung zu

Agranulocytose zu führen, nichts ausgesagt werden. Die chronische Verabreichung eines Arzneimittels führt bei Versuchstieren zu Störungen des Allgemeinzustandes, deren Schweregrad bei Berücksichtigung der Dosierung als Maß für die allgemeine Verträglichkeit der geprüften Substanz gelten kann. Durch die Beurteilung der unspezifischen Knochenmarksveränderungen ergibt sich somit die Möglichkeit, andere Untersuchungsmethoden zur Bewertung der chronischen Toxicität in objektiver Weise zu ergänzen.

## Zusammenfassung.

Die fortgesetzte Verabreichung von nicht spezifisch knochenmarksaktiven Arzneimitteln an Ratten führt bei Verwendung großer Dosen zu histopathologisch faßbaren Veränderungen des Knochenmarkes. Diese bestehen in einer Atrophie und Umgestaltung des Fettgewebes mit reaktiver Gefäßerweiterung und Ödembildung. Schwere toxische Schäden äußern sich außerdem in Knochenmarksblutungen und Kernpyknose der Megakaryocyten. Diese Reaktionen des Knochenmarksstromas werden — genügend hohe Dosierung vorausgesetzt — mit verschiedensten, gut verträglichen Arzneimitteln beobachtet, sind somit *unspezifisch* und lassen nicht auf eine knochenmarksschädigende Wirkung bei therapeutischer Anwendung am Menschen schließen.

Dagegen sind die beschriebenen Markveränderungen Ausdruck für die „allgemeine Verträglichkeit" von Arzneimitteln. Ausdehnung und Schweregrad der Markveränderungen verhalten sich zur Überlebenszeit der Versuchstiere reziprok, wie am Beispiel von Isonicotinsäurehydrazid und einiger seiner Derivate gezeigt wird.

## Literatur.

Askanazy, M.: Handb. spez. path. Anat. u. Histol. von Henke-Lubarsch. S. 885ff. Berlin: Springer 1927. — Bollag, W.: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 1027. — Borst, M.: Zbl. Path. Sonderbd. zu Bd. **83**, 306 (1923) (Festschrift M. B. Schmidt). — Dameshek, W.: Blood **7**, 755 (1952). — Postgraduate Medicine (London) **16**, 369 (1954). — Fust, B., O. Straub, E. Böhni u. A. Studer: Experientia (Basel) (im Druck). — Heilmeyer, L.: Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. **10**, 159 (1954). — Isler, O., H. Gutmann, O. Straub, B. Fust, E. Böhni u. A. Studer: Helvet. chim. Acta **38**, 1955 (im Druck). — Jolly, J.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **83**, 899 (1920). — Jürgens, R., u. A. Studer: Acta haematol. (Basel) **5**, 45 (1951). — Miller, D. K.: Science (Lancaster, Pa.) **80**, 320 (1934). — Möschlin, S., H. Meyer, L. G. Israels and E. Tarr-Gloor: Acta haematol. (Basel) **11**, 73 (1954). — Orsós, F.: Beitr. path. Anat. **76**, 36 (1926); **78**, 551 (1927). — Paul, J. T., and L. R. Limarzi: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **43**, 29 (1940). — Rohr, K.: Das menschliche Knochenmark. Stuttgart: Thieme 1949. — Spicer, S. S., F. S. Daft, W. H. Sebrell and L. L. Ashburn: Publ. Health Rep. **1942**, 1559. — Undritz, E.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 333. — Haematologische Tafeln „Sandoz". Basel 1952.

Dr. G. Zbinden und Doz. Dr. A. Studer, Medizin. Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 197—206 (1955).

Aus dem Pathologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung und Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen (Direktor: Prof. Dr. Gg. Herzog).

# Histochemische Untersuchungen an Gewebekulturen über den Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle in Abhängigkeit vom Kaliumgehalt des Nährmediums*.

Von

A. Taupitz.

Mit 7 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 28. März 1955.)*

Der Beurteilung der Kaliumfunktionen in den einzelnen Geweben steht die Schwierigkeit entgegen, rein versuchstechnisch den Baustoffwechsel dieses Elementes von seinen Aufgaben als chemisch-physikalischer Regulator zu trennen. Dennoch war es bisher möglich, einige spezielle Funktionen des Kaliums im Körper zu ermitteln, indem mittels verschiedener Methoden die Wirkung veränderter extracellulärer Kaliumkonzentrationen auf den Zellstoffwechsel und auf die energetische Leistung der Zelle untersucht wurde.

So konnte Druckrey an Speicheldrüsenschnitten durch Gasstoffwechselversuche nachweisen, daß die Erholungsphase erregter Zellen und der normale Ablauf der Glykose im Erregungsstoffwechsel an die Gegenwart extracellulären Kaliums gebunden ist. Frunder u. Aebi zeigten ebenfalls an Gewebsschnitten, daß deren Sauerstoffverbrauch von der extracellulären Kaliumkonzentration abhängig ist. Von Buchanan, Hastings u. Nesbett wurde gefunden, daß die Glykogenbildung in Leberschnitten nur dann optimal erfolgt, wenn die Suspensionsflüssigkeit eine genügende Menge Kalium enthält.

In Untersuchungen an isolierten Organen kamen Fleckenstein u. Mitarb. zu dem Ergebnis, daß Muskelpräparate in kaliumangereicherter oder kaliumverarmter Suspensionsflüssigkeit weitgehend unerregbar werden. Ähnliche Befunde zeitigten Kaliumveränderungen der Suspensionslösung am sich kontrahierenden, isolierten Herzmuskel (Salter u. Runes).

Dementsprechend kann die hohe Kaliumempfindlichkeit lebender Tiere mit intraperitonealer oder intravenöser Injektion nachgewiesen werden. Intraperitoneal liegt die letale Dosis zwischen 0,9 und 1,5 mg K/g Körpergewicht (Zweemer), intravenös bereits zwischen 0,032 und 0,035 mg K/g Körpergewicht (Mukoyama).

Angeregt durch diese Befunde sollten in der vorliegenden Arbeit einmal die Kaliumkonzentrationen im Nährmedium der Gewebekultur

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

Meinem verehrten Chef, Herrn Professor Dr. med. Gg. Herzog, zum 70. Geburtstag gewidmet.

ermittelt, zum anderen die Wirkung erhöhter extracellulärer Kaliumkonzentrationen auf die Gewebeexplantate mit Hilfe histochemischer Methoden festgestellt werden. Hierbei stand die Frage nach dem Kaliumeffekt auf den Glykogenhaushalt und die Phosphatase- und Dehydraseaktivität, sowie auf das Wachstum der Kulturen im Vordergrund.

## Material und Methodik.

Als Versuchsmaterial dienten Gewebekulturen von Milzen erwachsener Meerschweinchen und Ratten.

Die Milz wurde den Tieren während kurzer Äthernarkose entnommen, sofort auf Eis gebracht, mit Tyrodelösung übergossen und in Stückchen von etwa 1 mm Kantenlänge geschnitten.

Die Züchtung erfolgte mit Hilfe der Carrelschen Deckglasmethode bei einer konstanten Temperatur von 37,5° C.

Das Nährmedium enthielt 25% Extrakt aus 9 Tage alten Hühnerembryonen, 25% Tyrodelösung mit einem Gehalt von 0,01% K, 0,32% Na, 0,007% Ca und 50% Blutplasma von 200 g schweren männlichen Meerschweinchen oder von etwa 150 g schweren männlichen Ratten, das nach 12stündigem Hungern durch Herzpunktion unter leichter Äthernarkose entnommen wurde.

Der Mineralstoffgehalt dieses Nährmediums an Kalium (K), Natrium (Na), und Calcium (Ca) wurde flammenphotometrisch[1] ermittelt und ergab 0,030% K, 0,320% Na und 0,009% Ca. Normales Säugetierplasma enthält 0,020—0,025% K, 0,300—0,350% Na und 0,010—0,012% Ca. Somit läßt sich eine weitgehende Übereinstimmung für Na und Ca feststellen, während die K-Konzentration im Nährmedium um etwa 30% höher liegt.

Dem Nährmedium wurde Kalium in verschiedenen Mengen als chemisch reines KCl oder $KHCO_3$ in wäßriger Lösung zugegeben, so daß die Konzentrationen in den verschiedenen Versuchsreihen 0,01, 0,02, 0,03 und 0,05 Mol K je Liter betrugen.

Die Wasserstoffionenkonzentration (mit dem $p_H$-Ionenmeter gemessen) betrug im normalen Nährmedium 7,22 und stieg bei Erhöhung der K-Konzentration durch $KHCO_3$ auf 0,05 m/l auf 7,48 an.

Den modifizierten Nährmedien wurden frische Explanatate und bereits im Wachstum befindliche Kulturen (5—20 Tage alte Fibroblastenkulturen) für die Dauer von 48 Std ausgesetzt. Kontrollkulturen kamen in unverändertes Nährmedium.

Die Glykogenfärbung wurde mit der Methode nach Best an Totalkulturen ohne Einbettung durchgeführt. Die Fixierung erfolgte in 96% Alkohol. Die Kulturen wurden lediglich celloidiniert und anschließend mit Bestschem Carmin gefärbt.

Die Darstellung der Dehydraseaktivität erfolgte gemäß der von Knoth an Milzkulturen angewandten und beschriebenen Technik mit Hilfe des Reduktionsindicators TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid). Die Milzkulturen wurden mit einem Tropfen einer 1%igen, mit Veronal auf $p_H = 7{,}2$ gepufferten TTC-Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung) beschickt, wieder bedeckt, zuparaffiniert und für $2^1/_2$ Std im Brutschrank bei 37,5° C bebrütet, danach in 10%igem Formalin für 24 Std fixiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und in Glyceringelatine eingedeckt.

Zum histochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatasen nach Gomori erfolgte die Fixierung in 90%igem Alkohol (12 Std). Anschließend wurden die

[1] Die Ausführungen der Analysen verdanke ich Herrn Dr. Herrmann (Physikalisches Laboratorium der Dermatologischen Klinik Gießen).

Kulturen ohne Einbettung sogleich in die von Neumann angegebene modifizierte Bebrütungslösung ($p_H$ 9,3) eingestellt und bei 38° C für 8 Std aufbewahrt. Danach gelangten sie nach Abspülen mit destilliertem Wasser für 2 min in 2%iges Kobaltnitrat und für 1 min in eine verdünnte Schwefelammonium-Lösung. Daraufhin aufsteigende Alkoholreihe und Einbettung.

Ein Teil der Kulturen wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die besprochenen Ergebnisse bringen das Mittel der verschiedenen Versuchsreihen zum Ausdruck. Sie wurden gewonnen, indem die einzelnen Kulturen nach einem bestimmten Schema ausgepunktet und bewertet wurden.

## Versuchsergebnisse.

*A. Wachstum.* Das Wachstum der Meerschweinchenmilz in den Kontrollkulturen erfolgt auf die bereits früher von Gg. Herzog u. Börner eingehend beschriebene Weise.

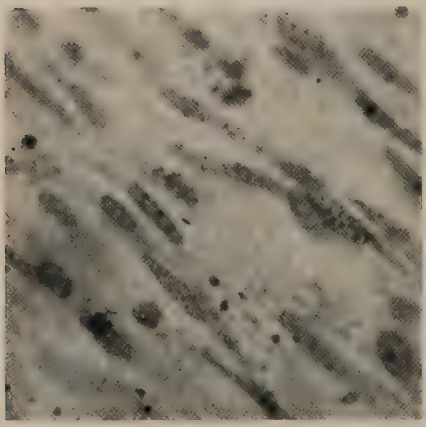
Bei einer molaren K-Konzentration von 0,01—0,02 im Nährmedium ist neben einer wahrnehmbaren Verminderung der Lymphocyten die Emigration der Makrophagen eingeschränkt. Bereits im Wachstum befindliche 10—18 Tage alte Fibroblastenkulturen der Milz lassen an der Peripherie des Wachstumshofes Zellen erkennen, die sich isoliert haben und im Sinne einer Abrundung verändert sind. Die im Bereich des Wachstumshofes im normalen Nährmedium vorhandenen schlanken und spießigen Fibroblasten sind bei dieser Konzentration verbreitert und zeigen zunehmend wabige Plasmastrukturen.

Bei einer auf 0,03 und 0,05 mol K gesteigerten Nährmediumkonzentration sind neben erheblich vermindert ausgewanderten Lymphocyten nur vereinzelt abgerundete Makrophagen im Nährmedium vorhanden. Die Fibroblasten der älteren Kulturen erscheinen an der Peripherie sowohl wie im Wachstumshof erheblich abgerundet. Im Cytoplasma dieser Zellen treten vermehrt Vacuolen auf. Das Wachstum der Milzkulturen erwachsener Ratten ist dem der Meerschweinchenmilz-Kulturen weitgehend vergleichbar.

*B. Glykogen.* Glykogen läßt sich in der normalwachsenden Milzkultur kaum darstellen; ein Befund, der sich mit den Untersuchungsergebnissen von Deicher deckt (Abb. 1). Lediglich die in den ersten Stunden emigrierenden Lymphocyten und gelapptkernigen Granulocyten zeigen vereinzelt Glykogen in Form von gröberen oder feineren Körnchen. Die nachfolgend emigrierenden Makrophagen und die ab 3.—4. Tag auswandernden Fibroblasten lassen dagegen nur in den seltensten Fällen staubartige rötliche Anfärbungen im Cytoplasma erkennen.

Bei Konzentrationen von 0,01 mol K im Nährmedium weisen rundzellige Elemente und gelapptkernige Granulocyten leuchtend rot angefärbtes Glykogen im Bereich des Cytoplasmas auf. Im kernnahen Bereich der Fibroblasten und Makrophagen treten zum Teil kleinschollige

bis granuläre Glykogenvorkommen in wechselndem Ausmaß in Erscheinung. Besonders ausgedehnt und dicht sind diese Glykogenvorkommen bei einer Nährmediumskonzentration von 0,02 mol K (Abb. 2).



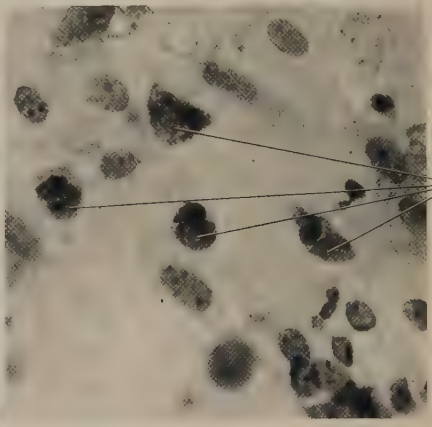



Abb. 1 und 2. Ausschnitte aus den Wachstumshöfen 11 Tage alter Fibroblastenkulturen der Meerschweinchenmilz. Glykogenfärbung nach Best, Kernfärbung mit Hämatoxylin. Links Standardnährmedium. Rechts Nährmedium mit einer auf 0,02 m erhöhten K-Konzentration. Hier finden sich Glykogenvorkommen in abgerundeten Fibroblasten. Photo: Vergrößerung 360fach.

Bei älteren reinen Fibroblastenkulturen fällt auf, daß nicht alle Fibroblasten gleichmäßig diese Glykogenvorkommen besitzen sondern nur 60—65% der Zellen. Je reichlicher eine Zelle Glykogen enthält, desto vollständiger erscheint ihre Abrundung, wie es durch Abb. 3 verdeutlicht wird. Hier ist das gesamte Cytoplasma angefüllt mit in sich aufgelockerten, schaumigen und zusammenhängenden Glykogenmassen.

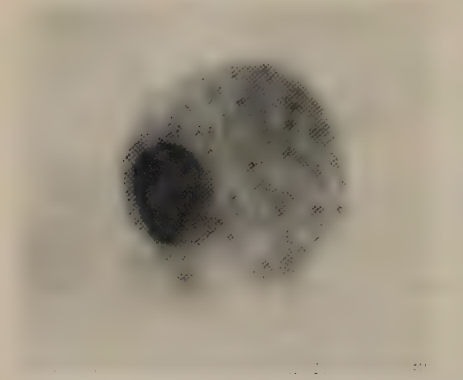


Abb. 3. Abgerundeter und aus dem Zellverband herausgelöster Fibroblast mit körnigen und schaumigen Glykogenvorkommen im Cytoplasma. K-Konzentration im Nährmedium 0,02 mol, Glykogenfärbung nach Best, Kernfärbung mit Hämatoxylin. Photo: Vergrößerung 880fach.

Im Konzentrationsbereich von 0,03 und 0,05 mol K im Nährmedium ist dagegen Glykogen nur noch in geringerem Ausmaß nachzuweisen.

Die Zellen der Rattenmilz-Kulturen weisen keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich mit denen der Meerschweinchenmilz-Kulturen auf.

*C. Dehydrasen.* In den Kontrollkulturen zeigen die in den ersten Stunden auswandernden Lymphocyten und gelapptkernigen Granulocyten keinerlei Formazan-Kristallbildungen. Ebenso sind die nachfolgend emigrierenden Makrophagen in der Regel kristallfrei. Dagegen sind in den ab 3.—4. Tag auswachsenden langen, spießigen Fibroblasten kleine bis mittelgroße Kristalle zu erkennen, die bei älteren Kulturen im gesamten Bereich des großen Wachstumshofes zu finden sind (Abb. 4). Daneben

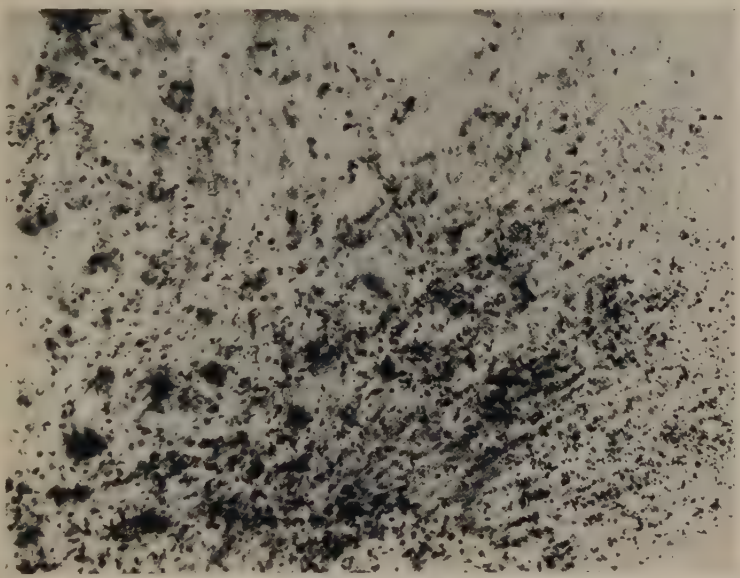


Abb. 4. Ausschnitt aus dem Wachstumshof einer 18 Tage alten Fibroblastenkultur der Meerschweinchenmilz. TTC-Reaktion. Im gesamten Bereich des Wachstumshofes finden sich zahlreiche Formazankristalle. Photo: Vergrößerung 135fach.

finden sich noch Kristalle in allen Größenordnungen, zum Teil als verzweigte, büschelartige Kristallsplitter sowie als kleine Tafeln.

Bei Erhöhung der Konzentration auf 0,01 mol K sind in Art und Ausdehnung der Kristallbildungen keine Veränderungen wahrzunehmen.

Im Bereich von 0,02 mol K lassen die Zellen der Wachstumshöfe die Kristallbildung weitgehend vermissen. Die bei einem Teil der Kulturen vorhandenen Kristalle sind klein, zum Teil staubförmig und überwiegend in der Nähe des Mutterstückrandes zu finden. Die Fibroblasten zeigen bei dieser Konzentration vermehrt im Cytoplasma liegende granuläre Einschlüsse von blaßrötlicher Farbe.

Bei 0,03 und 0,05 mol K im Nährmedium können keine Kristallbildungen mehr beobachtet werden. Lediglich die vermehrt auftretenden granulären und tropfigen Einschlüsse lassen blaßrötliche Anfärbungen erkennen (Abb. 5).

An den Kulturen der Rattenmilz können dieselben Befunde erhoben werden.

*D. Alkalische Phosphatasen.* Alkalische Phosphatasen sind in den Kontrollkulturen der Meerschweinchenmilz in den sich durch amöboide Beweglichkeit auszeichnenden Makrophagen sowohl im Zellkern als auch

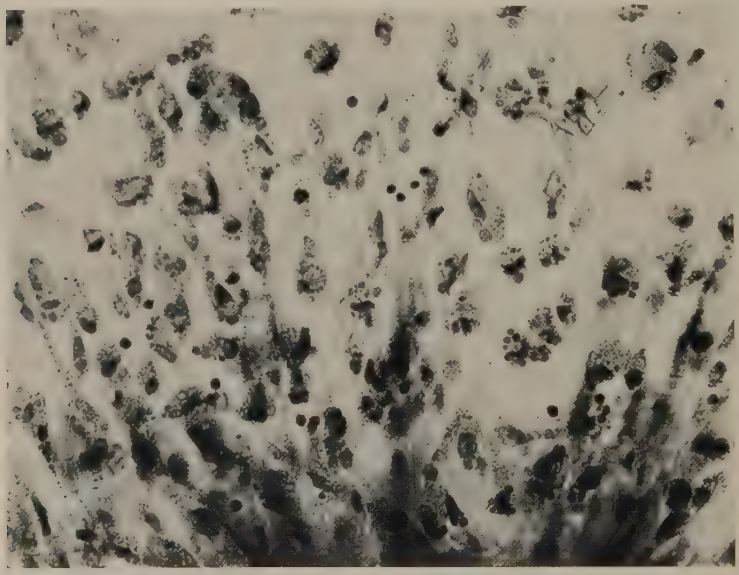


Abb. 5. Wachstumshof einer Fibroblastenkultur der Meerschweinchenmilz, 17 Tage alt. Kaliumgehalt des Nährmediums auf 0,03 mol erhöht. TTC-Reaktion. Im Cytoplasma der z. T. erheblich abgerundeten Zellen sind zahlreiche blasse, ungefärbte und blaßrötlich angefärbte tropfige Einschlüsse zu erkennen. Keine Formazankristalle. Kernfärbung mit Hämalaun. Photo: Vergrößerung 220fach.

im Cytoplasma reichlich nachweisbar (Abb. 6). Dagegen zeigen die Fibroblasten im Cytoplasma geringere Reaktionen

Im Bereich der K-Konzentration von 0,01 mol K im Nährmedium ist die Phosphatasereaktion im Cytoplasma der Makrophagen und Fibroblasten gering, zum Teil kaum wahrnehmbar vermindert. Bei 0,02 mol K in der Nährflüssigkeit ist sie deutlich verringert. Die vordem zahlreichen granulären und diffusen Schwärzungen im Zellkern und Plasma nehmen an Farbintensität ab, wobei die Abnahme im Cytoplasma besonders auffallend ist (Abb. 7). Auch bei weiterer Erhöhung der Nährmediumskonzentration auf 0,03 und 0,05 mol K nimmt die Plasmaphosphatase stärker ab als die Kernphosphatase; bei 0,05 mol K sind nur noch in einem Teil der Zellkerne vereinzelt Schwärzungen sichtbar.

Die Kulturen der Rattenmilz verhalten sich in bezug auf das Vorkommen der alkalischen Phosphatasen den Meerschweinchenkulturen analog.

Eine Übersicht über die Ergebnisse vermittelt nachstehende Tabelle:

| Nährmedium | Wachstum | Glykogen | Dehydrasen | alk. Phosphat. |
|---|---|---|---|---|
| Standart-Nährmedium | ++++ | ———(+) | +++ (+) | +++ (+) |
| 0,1 mol K . . . | +++ (+) | ——++ | +++ (+) | ++ (++) |
| 0,02 mol K . . | + (+)—— | —(+)++ | +——— | ++—— |
| 0,03 mol K . . | (+)——— | ———+ | ——— | (+)——— |

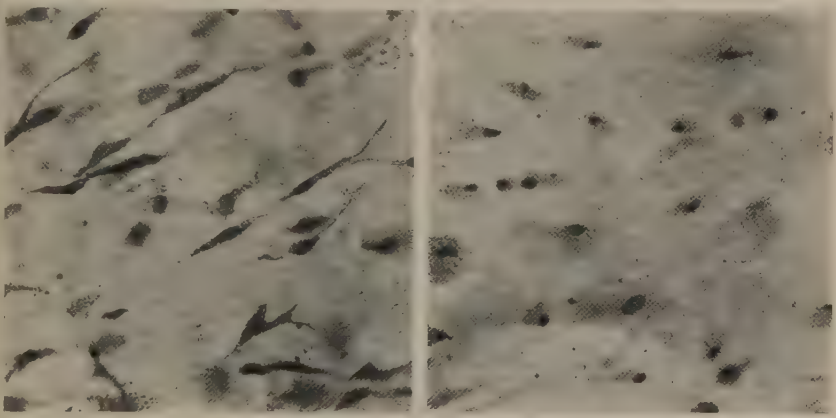


Abb. 6 und 7. Ausschnitte aus den Wachstumshöfen 106 Std alter Meerschweinchenmilzkulturen. Alkalische Phosphatasereaktion nach GOMORI. Links Standardnährmedium. Makrophagen zeigen im Zellkern und ihm Cytoplasma positive Reaktionen. Rechts Nährmedium mit einer auf 0,02 mol erhöhten K-Konzentration. Weitgehend aufgehobene Reaktionen im Cytoplasma der Zellen. Photo: Vergrößerung 220fach.

## Besprechung der Ergebnisse.

Wie aus den dargelegten Untersuchungen über die Einwirkung steigender Kaliumkonzentrationen auf Gewebekulturen hervorgeht, entfaltet Kalium im Zeitraum von 48 Std bereits bei einer Konzentration von 0,01—0,02 mol in der Extracellularflüssigkeit und erst recht bei höheren Konzentrationen eine Hemmwirkung auf das Wachstum der Explantate und auf das Vorkommen an Dehydrasen und alkalischen Phosphatasen. Zugleich erreicht das bei 0,01 mol K geringgradig nachweisbare Glykogen bei Erhöhung auf 0,02 mol K ein maximales Ausmaß, um bei weiterer Erhöhung der Kaliumkonzentration wieder abzunehmen.

Um diese Befunde erklären zu können, ist es zweckmäßig, auf die Eigenart des Energiestoffwechsels der in vitro wachsenden Zelle hinzuweisen.

Die Explantate werden bei der Entnahme aus dem Gewebe zumindest an den Schnitträndern geschädigt. Diese Zellschädigung übt zusammen mit den bisher nicht näher definierten wachstumsfördernden Stoffen des Embryonalextraktes einen starken Wachstumsreiz auf die Zellverbände aus, und der aus diesem Zustand resultierende Schädigungs- oder Wachstumsstoffwechsel ist dadurch gekennzeichnet,

daß der glykolytische Abbau an den energieliefernden Prozessen stärker beteiligt ist als der oxydative. Die Deckung des Energiebedarfes für Wachstum, Teilung und Formerhaltung der Zellen mit Hilfe der Glykolyse ist typisch für die Gewebekultur (Lettré) und stellt sie in auffälliger Gegensätzlichkeit dem stationären, nicht erregten Gewebe und dem Stoffwechsel ruhender Gewebe gegenüber. Hierbei ist es bemerkenswert, daß zwischen Geweben mit Ruhestoffwechsel und solchen mit Schädigungsstoffwechsel ein Unterschied in der Reaktion gegenüber extracellulären Kaliumveränderungen besteht.

Durch Brook, Druckrey u. Herken konnte nachgewiesen werden, daß sich im Ruhestoffwechsel befindliche Gewebsschnitte durch relative Unempfindlichkeit gegenüber Kaliummangel auszeichnen. Auch ist von verschiedenen Autoren (Frunder, Aebi) deutlich gemacht worden, daß der Sauerstoffverbrauch nichtwachsender und nichterregter Gewebsschnitte auch durch Steigerung der Kaliumkonzentration in der Suspensionsflüssigkeit über den physiologischen Kaliumgehalt des Serums hinaus nicht herabgesetzt wird.

Demgegenüber fanden Druckrey u. Mitarb. schon 1939, daß die Stoffwechselleistung erregter Speicheldrüsenschnitte vom Vorhandensein physiologischer Kaliummengen im Zellinnen- und -außenraum abhängt.

Weitere Versuche von Fleckenstein u. Mitarb. über die Kontraktionsleistung isolierter Muskelpräparate in Abhängigkeit vom Kaliumgehalt der Suspensionslösung erhärteten die Auffassung, daß allgemein Organe und Zellverbände mit überwiegendem Leistungsstoffwechsel eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Kalium-Konzentrationsveränderungen besitzen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch das Versagen der Herzmotorik in vivo nach intraperitonealen und intravenösen Kaliuminjektionen sowie die adynamische Krise nach Nebennierenrinden-Exstirpation bei Hyperkaliämie Zeichen dieser Art sind.

Wird, wie in den vorliegenden Untersuchungen durch Erhöhung der Kaliumkonzentration des extracellulären Raumes das Elektrolytgleichgewicht gestört, so kommt es durch Unterbrechung der permanenten Energiezufuhr zu der vielfach erwähnten Erscheinung des Verfließens der typischen osmotischen Konzentrationen, zur Abnahme des Zellgrenzflächenpotentials und zum „Leckwerden" der Zellmembranen für Kaliumionen. Natriumeinwanderung und Quellung der Zelle kennzeichnen den Folgezustand.

Die Annahme einer allgemeinen Drosselung der glykolytischen und oxydativen Stoffwechselvorgänge auf diesem Wege durch Erhöhung der extracellulären Kaliumkonzentration wäre die Voraussetzung für ein Verständnis der hier dargelegten Versuchsergebnisse.

Da alkalische Phosphatasen und Dehydrasen in der normal wachsenden Milzkultur erwachsener Meerschweinchen und Ratten weitaus reichlicher als im stationären Gewebe vergleichbarer Art nachzuweisen sind, wie durch Untersuchungen von Chevremont, Knoth und mir selbst ermittelt werden konnte, scheint es berechtigt zu sein, sie als Gradmesser für den Umfang der Stoffumsätze heranzuziehen.

Die vorliegenden Untersuchungen stellen den bisherigen Ergebnissen von Arbeiten über den Zellstoffwechsel in Abhängigkeit von extracellulärer Elektrolytverschiebung, die durch quantitative Messungen des Gas-

verbrauches an Gewebsschnitten und Kontraktionsmessungen an Muskelpräparaten gewonnen wurden, Befunde histochemischer Reaktionen an Gewebekulturen gegenüber.

Obwohl der histochemische Nachweis eine relativ grobe Methode darstellt und eine exakte quantitative Messung hierbei nicht möglich ist, gewährt er einen wesentlichen Einblick in den Umfang des Zellstoffwechsels. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß sich die Befunde nur auf Gewebekulturen nichtembryonalen Ursprungs beziehen und nur mit solchen unter adäquaten Züchtungsbedingungen gewonnenen verglichen werden dürfen.

In diesem Zusammenhang ist die Beziehung zwischen Kulturwachstum und Kaliumgehalt des Nährmediums in der Gewebezüchtung von besonderem Interesse. Bisher konnte von verschiedenen Forschern (Albert u. Hecht, Carrel, Fischer) sowie auch durch eigene Untersuchungen ermittelt werden, daß ein optimales Zellwachstum in der Kultur von einem ganz bestimmten Konzentrationsverhältnis der Nährmediumskomponenten untereinander abhängig ist. Es ergab sich, daß Embryonalextrakt in Konzentrationen über 25% in der Nährflüssigkeit nicht mehr optimal wachstumsanregend wirkt, obwohl er gerade wegen seiner wachstumsfördernden Eigenschaften bereits von Carrel in die Gewebezüchtung eingeführt wurde. Dieses bisher noch unbefriedigend erklärte Phänomen ließe sich mit Hilfe der hier vorliegenden Untersuchungen deuten. Der Eiinhalt weist einen Kaliumgehalt von durchschnittlich 0,03 mol auf (König, Stahn). Der Extrakt, der aus dem 9 Tage alten zerkleinerten Hühnerembryo hergestellt wird, verfügt über einen Kaliumgehalt von 0,018 mol. Wie aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit gefolgert werden muß, vermag demnach bereits ein Anteil an Embryonalextrakt im Nährmedium in Höhe von 40% das optimale Wachstum der Zellkultur nicht mehr zu gewährleisten, da die Kaliumkonzentration im Nährmedium bei dieser Zusammensetzung 0,01 mol wäre.

## Zusammenfassung.

Gewebekulturen von Milzen erwachsener Meerschweinchen und Ratten wurden in einem durch steigende Kaliumgaben modifizierten Nährmedium gezüchtet. Während 48 Std der Einwirkung wurde der Kaliumeffekt auf das Wachstum beobachtet. Nach 48stündiger Einwirkung wurde das Glykogenvorkommen mit Hilfe der Bestschen Glykogenfärbung, der Gehalt an alkalischen Phosphatasen nach dem Verfahren Gomoris festgestellt und die Dehydraseaktivität mit Hilfe der TTC-Reaktion ermittelt.

An den Kontrollkulturen läßt sich kaum Glykogen nachweisen. Dehydrasen und alkalische Phosphatasen sind reichlich darzustellen.

Bei Erhöhung der molaren Kaliumkonzentration im Nährmedium auf 0,01 tritt eine wahrnehmbare Hemmung des Wachstums auf. Die Zellen enthalten in geringem Maße Glykogen. Das Phosphatasevorkommen ist wahrnehmbar vermindert, während die Dehydrasebefunde unverändert sind.

Im Bereich der Kaliumkonzentration von 0,02 mol ist Glykogen in reichlichem Maß vorhanden. Dehydrasen und Phosphatasen können nur noch in geringem Umfang dargestellt werden.

Bei 0,03 und 0,05 mol Kalium ist das Wachstum der Kulturen fast aufgehoben. Dehydrasen und alkalische Phosphatasen sind nur noch vereinzelt nachzuweisen. Das Glykogenvorkommen ist vermindert.

## Literatur.

Aebi, H.: Helvet. physiol. Acta **11**, 96 (1953). — Albert, A., u. E. Hecht: Arch. exper. Zellforsch. **14**, 347 (1937). — Best, F.: zit. n. Roulet, F.: Meth. d. Path. Histologie, S. 256, Wien 1948. — Buchanan, J., B. Hastings and F. Nesbett: J. of Biol. Chem. **180**, 435 (1949). — Carrel, A.: J. of Exper. Med. **38**, 499 (1923). — Chevremont, M., et H. Firket: Archives de Biol. **60** 441 (1949). — Deicher, H.: Arch. exper. Zellforsch. **14**, 236 (1933). — Druckrey, H., N. Brook u. H. Herken: Biochem. Z. **302**, 393 (1939). — Fischer, E.: Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro 1930, S. 18—32. — Frunder, H.: Hoppe-Seylers Z. **291**, 217 (1952). — Gomori, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 23 (1939). — Herzog, Gg., u. J. Börner: Zbl. Path. **44**, 137 (1928). — Knoth, W.: Z. Krebsforsch. **59**, 347 (1953). — König, G.: Handbuch der Nahrungsmittelkunde **11**, 426 (1939). — Mukoyama, J.: Biochem. Z. **157**, 303 (1925). — Verh. dtsch. Ges. Path. Kiel, 1949, S. 8. — Neumann, K.: zit. n. Eger, W.: Virchows Arch. **322**, 645 (1952). — Salter, T., and A. Runes: Amer. J. Physiol. **165**, 520 (1951). — Stahn, E.: Inaug. Diss. agr. Göttingen 1953. — Taugner, R., H. Fleckenstein u. A. Lohmüller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 219 (1950). — Zweemer, G.: J. of Exper. Zool. **113**, 649 (1950). — Lettré, H.: Z. Krebsforsch. **58**, 621 (1951/52).

Dr. Artur Taupitz, Gießen, Pathologisches Institut, Klinikstr. 32g.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 207—218 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg/Br.
(Direktor: Professor Dr. med. S. Janssen).

# Vergleichende Pharmakologie und Toxikologie der Laxantien.

Von
L. Schmidt.

Mit 5 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 25. April 1955.)*

Über die Wirkung der Laxantien, insbesondere der synthetischen Abführmittel, gibt es nur wenige experimentelle Untersuchungen. Die vorhandene Literatur erstreckt sich vorwiegend auf eine klinische Prüfung, die pharmakologischen Ergebnisse sind zum Teil überholt.

Auch über die Toxicität der üblichen Laxantien existieren praktisch keine Angaben, obwohl die Giftwirkungen einiger Stoffe (Aloe, Phenolphthalein) bekannt sind.

Als rezeptfreie Arzneimittel werden die Abführmittel ohne ärztliche Kontrolle verwendet. Wegen der eintretenden Gewöhnung wird die therapeutische Dosis oft um ein Mehrfaches überschritten, und dies kann gelegentlich zu Intoxikationen führen. Außerdem werden die Laxantien häufig über Monate und Jahre hinweg genommen, wobei mit der Möglichkeit von Spätschäden zu rechnen ist, bei deren Diagnose an den früher erfolgten Massenkonsum irgendwelcher Abführmittel nicht gedacht wird. Zweifellos ist die Zahl der Vergiftungsfälle größer als aus der Literatur hervorgeht (Oettel[10], Starkenstein[14]). Aus diesem Grunde schien es angezeigt, vergleichende pharmakologische und toxikologische Prüfungen der hauptsächlichsten Wirkstoffe vorzunehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Stoffe untersucht worden: Aloin, Cascara sagrada, Senna-Reinglykoside und 1,8-Dioxyanthrachinon aus der Reihe der Anthrachinone; Phenolphthalein und Diacetoxy-diphenylisatin (Isacen) aus der Reihe der synthetischen Laxantien.

Außerdem wurden 3 weitere untersucht, die nicht in die Therapie eingeführt sind:

4,4′-dioxy-triphenyl-methan (La 25), (4,4′-dioxy-diphenyl)-(6-methyl-pyridyl-2)-methan (La 76), (4,4′-dioxy-diphenyl)-(chinolyl-2)-methyl-methan (La 87).

Diese 3 Substanzen hatten sich als gut abführend erwiesen.

Der Vollständigkeit halber wurden die Werte des von uns schon früher untersuchten (4,4′-diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-2)-methans (Laxans Thomae)* in die Tabellen mit aufgenommen.

* Diese Substanzen wurden uns von der Fa. Karl Thomae zur Verfügung gestellt.

Die pharmakologische Prüfung wurde auf diejenigen Stoffe beschränkt, von denen tierexperimentelle Untersuchungen nicht bekannt sind. Dagegen wurden *sämtliche* Stoffe auf ihre Toxicität untersucht.

## Pharmakologischer Teil.

### *1. Allgemeines.*

Zur Prüfung von Abführmitteln wurde seit den Untersuchungen von Magnus[9] und Lenz[3–6] die Katze als das bestgeeignete Versuchstier angesehen.

Führer[1] führte zur Wertbestimmung der Laxantien die weiße Maus ein; er fand das Wirkungsverhältnis weiße Maus: Mensch = 1:160.

Das Kaninchen versagt als Versuchstier, wahrscheinlich wegen des besonders großen Blinddarmes. In unseren Versuchen reagierte der *isolierte* Kaninchendünndarm und Dickdarm auf Laxantien normal. In Amerika wurde der Rhesusaffe zur Auswertung von Purgantien herangezogen (Loewe[8]).

Bei Ratten (Gewicht 100—120 g) waren, wie in eigenen Vorversuchen festgestellt wurde, sämtliche bekannten Abführmittel wirksam. Die Ursache dürfte die große Ähnlichkeit des Magen-Darm-Kanals der Ratte mit dem des Menschen sein. Auch ist sie als Omnivore in der Ernährung dem Menschen ähnlich. Der Hauptunterschied ist der verhältnismäßig große Blinddarm, der allerdings nicht die Ausmaße wie bei ausgesprochenen Pflanzenfressern erreicht.

Aus diesen Gründen wurde die Mehrzahl meiner Versuche an Ratten durchgeführt, jedoch kamen zur genaueren Prüfung auch andere Versuchstiere zur Verwendung. Zur Feststellung der Wirkungsweise und des Angriffsortes dienten Hunde, Katzen und Kaninchen. Die Toxicität wurde *ausschließlich* an Ratten bestimmt.

### *2. Bestimmung der Wirkungsdosis.*

Die Substanzen wurden Ratten von 100—120 g in öliger Anschlemmung mit der Schlundsonde appliziert. Pro Substanz wurden 80—120 Versuche durchgeführt. Als Wirkungsdosis wurde diejenige Substanzmenge festgelegt, die gerade noch zur Absetzung ungeformten Stuhles führte.

*Ergebnisse*: Siehe Tab. 1. Zum Vergleich sind auch diejenigen Dosen mit aufgenommen, die für den Menschen als therapeutische gelten.

*Tabelle 1.*

| Substanz | Wirkungsdosis in mg pro kg Ratte p. os | Wirkungsdosis in mg pro Mensch p. os | Wirkungsdosis nach s.c. Applikation in mg/kg |
|---|---|---|---|
| Aloin | 210 | 100—300 | 300 |
| Cascara sagrada | 300 | 100—300 | 400 |
| 1,8-Dioxyanthrachinon | 300 | 150—450 | 500 |
| Senna-Reinglykoside | 60 | 24—48 | 60 |
| Phenolphthalein | 160 | 100—200 | 640 |
| Diacetoxy-diphenyl-isatin | 20 | 5—20 | 80 |
| (4,4′-diacetoxy-diphenyl)-(pyridil-2)-methan | 15 | 5—20 | 120 |
| Substanz La 25 | 60 | 50—80 | 240 |
| Substanz La 76 | 15 | 5—20 | 120 |
| Substanz La 87 | 20 | 10—30 | 130 |

### *3. Versuche am isolierten Darm.*

*Methodik:* Anordnung von MAGNUS, Dünn- und Dickdarm von Katzen, Kaninchen und Ratten. (Die Anthrachinone wurden nicht untersucht, da genügend Befunde in der Literatur vorliegen.) Pro Substanz und Tierart wurden 40 Versuche

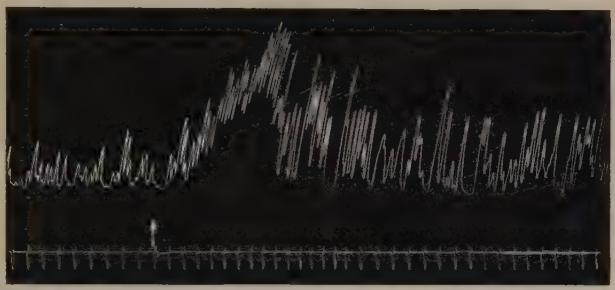


Abb. 1. Isolierter Katzendünndarm. Zeitschreibung: Minuten. Beim Pfeil Zugabe von 50 $\gamma$ La 87 (in 0,1 cm³ Propylenglykol gelöst).

durchgeführt, die sich zur Hälfte auf Dünn- und Dickdarm verteilten. Wegen ihrer Wasserunlöslichkeit wurden die Stoffe in Propylenglykol gelöst, wobei nie mehr als 0,2 cm³ Propylenglykol auf 100 cm³ Badeflüssigkeit (Tyrode) zugegeben wurde.

*Ergebnisse:* Übereinstimmend konnte für sämtliche Substanzen festgestellt werden, daß sie eine Anregung sowohl des isolierten Dickdarmes als auch des Dünndarmes herbeiführen. Am Dünndarm war die Anregung durchweg sehr gering, am Dickdarm stets sehr deutlich.

Die für den isolierten Darm notwendien Dosen waren je 100 cm³ Tyrodelösung:

| | Dünndarm | Dickdarm |
|---|---|---|
| Diacetoxy-diphenyl-isatin | 2 $\gamma$—20 $\gamma$ | 2 $\gamma$—10 $\gamma$ |
| La 25 | 2 $\gamma$—1 mg | 5 $\gamma$—30 $\gamma$ |
| La 76 | 1—5 mg | 1 $\gamma$—60 $\gamma$ |
| La 87 | 10 $\gamma$—50 $\gamma$ | 1 $\gamma$—10 $\gamma$. |

Höhere Dosen lähmten die isolierten Darmstücke. Als Beispiel dienen die Abb. 1—3, die die Wirkungen einiger Stoffe auf den isolierten Darm verschiedener Tierarten zeigen.

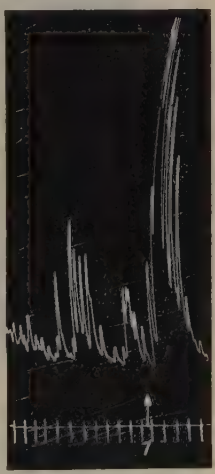


Abb. 2. Isolierter Kaninchendickdarm. Zeitschreibung: Minuten. Beim Pfeil Zugabe von 5 $\gamma$ Diacetoxy-diphenyl-isatin (in 0,1 cm³ Propylenglykol gelöst).

### *4. Durchströmungsversuche.*

*Methodik:* Mit der von STRAUB und TRIENDL[15] angegebenen Methode wurde der Dünn- und Dickdarm mit Leitungswasser und anschließend mit einer wäßrigen Anschlemmung der verschiedenen Substanzen durchströmt. Versuchstiere waren ausschließlich Katzen. Pro Substanz wurden je 5 Versuche am Dünndarm und je 5 Versuche am Dickdarm ausgeführt.

*Ergebnisse:* Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tab. 2 wiedergegeben. Im wesentlichen regten die untersuchten Substanzen den Dünndarm wenig oder gar nicht und den Dickdarm stark an.

Tabelle 2. *Ergebnisse der Darmdurchströmung.*
Die Zahlen geben die geförderte Flüssigkeitsmenge in Kubikzentimetern je 15 min an.

| Dünndarm | | Dickdarm | | Dünndarm | | Dickdarm | | Dünndarm | | Dickdarm | | Dünndarm | | Dickdarm | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $H_2O$ | La 25 | $H_2O$ | La 25 | $H_2O$ | La 76 | $H_2O$ | La 76 | $H_2O$ | La 87 | $H_2O$ | La 87 | $H_2O$ | La X | $H_2O$ | La X |
| 18 | 23 | 23 | 38 | 30 | 32 | 25 | 45 | 15 | 15 | 26 | 49 | 16 | 18 | 36 | 68 |
| 15 | 24 | 20 | 56 | 28 | 30 | 30 | 45 | 19 | 18 | 28 | 61 | 18 | 12 | 42 | 80 |
| 19 | 25 | 15 | 45 | 25 | 34 | 25 | 50 | 18 | 20 | 27 | 64 | 15 | 20 | 40 | 64 |
| 15 | 25 | 15 | 50 | 34 | 38 | 28 | 37 | 17 | 21 | 26 | 60 | 17 | 19 | 38 | 65 |

* (La X = Diacetoxy-diphenyl-isatin.)

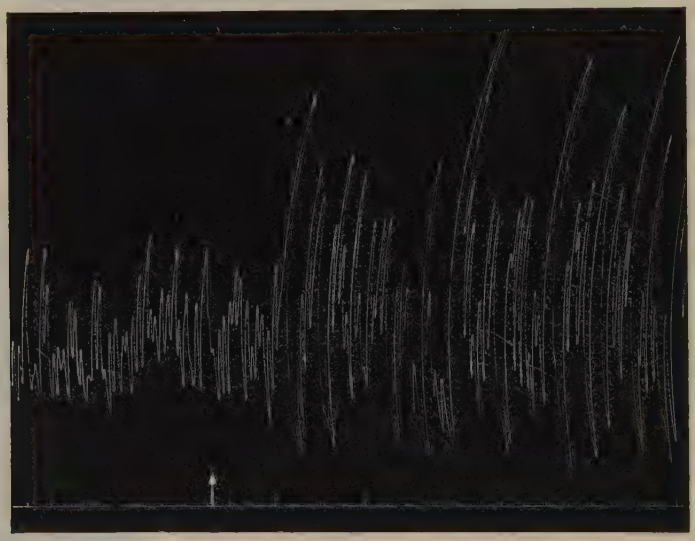


Abb. 3. Isolierter Katzendickdarm. Zeitschreibung: 30 sec. Beim Pfeil Zugabe von 2 $\gamma$ (4,4'-diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-2)-methan.

### 5. *Beschleunigung der Magen-Darm-Passage.*

*Methodik:* An Ratten wurde die von Loewe u. Faure[7] angegebene Methode in der von uns beschriebenen Modifikation verwendet[13]. Pro Substanz wurden 13 Versuche durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Entleerungsversuche wurden in Schemata übertragen und in Tab. 3 zusammengefaßt.

### 6. *Versuche mit Dünndarmunterbindung.*

*Methodik:* Da die Wirkung eines Abführmittels sowohl durch Kontakt mit der Dickdarmschleimhaut als auch durch Resorption und Wiederausscheidung in den

Dickdarm zustande kommen kann, wurde in einer Versuchsserie bei Ratten der Dünndarm unterbunden. Die Unterbindungsstelle befand sich etwa in der Hälfte des Dünndarmes. Derartig operierte Tiere überleben normalerweise 12—14 Tage.

*Tabelle 3.*

| Substanzen | Dosis mg/kg | Wirkungseintritt nach min |
|---|---|---|
| Kontrolltiere | | 240 |
| Aloin | 420 | 210 |
| Cascara sagrada | 600 | 210 |
| Diacetoxy-diphenyl-isatin | 40 | 150 |
| 1,8-Dioxyanthrachinon | 60 | 180 |
| Phenolphthalein | 120 | 180 |
| Senna-Reinglykoside | 60 | 240 |
| (4,4′-diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-2)-methan | 30 | 60 |
| Substanz La 25 | 120 | 150 |
| Substanz La 76 | 30 | 150 |
| Substanz La 87 | 60 | 150 |

Die Substanzen wurden in doppelter Wirkungsdosis per os zugeführt und es wurde geprüft, ob noch eine Abführwirkung eintrat. Pro Substanz wurden 30 Versuche gemacht.

*Ergebnisse:* Bei denjenigen Tieren, die Anthrachinonderivate erhalten hatten, kam es in allen Fällen zu einer deutlichen Laxierung. Dagegen war bei den mit synthetischen Stoffen behandelten Tieren niemals eine Abführwirkung zu verzeichnen.

*7. Wirkung nach subcutaner Applikation.*

*Ergebnisse:* Siehe Tab. 1.

## Toxikologischer Teil.

*1. Akute Toxicität.*

*a) Verträglichkeitsdosis.* Versuche zur Bestimmung der DL 50 für Aloin, Cascara sagrada, 1,8-Dioxyanthrachinon, Senna-Reinglykoside, Phenolphthalein, Diacetoxy-diphenyl-isatin, (4,4′-diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-2)-methan, La 25, La 76 und La 87 schlugen fehl, da die Streuungen derart groß waren, daß sie eine Berechnung der DL 50, trotz eines sehr großen Tiermaterials, ausschlossen. Deshalb wurde die Verträglichkeitsdosis für die einzelnen Stoffe ermittelt. Als Verträglichkeitsdosis wurde diejenige Substanzmenge angenommen, die bei 50 Ratten weder akute noch Spättodesfälle erzeugte. Aus dem Verhältnis von Wirkungsdosis:Verträglichkeitsdosis wurde die therapeutische Breite für die untersuchten Abführmittel berechnet.

*Ergebnisse:* Siehe Tab. 4.

*b) Prüfung der Nierenschädigung.* Da sämtliche Anthrachinonderivate zu einem wesentlichen Teil durch die Niere ausgeschieden werden und erhebliche Nierenschädigungen hervorrufen können, und da auch bei

*Tabelle 4.*

| Substanz | Verträglichkeitsdosis in g/kg | Therapeutische Breite |
|---|---|---|
| Aloin | 7,5 | 1:35 |
| Cascara sagrada | 6 | 1:2 |
| 1,8-Dioxyanthrachinon | 7 | 1:23 |
| Senna-Reinglykoside | 0,5 | 1:8 |
| Phenolphthalein | 7 | 1:43 |
| Diacetoxy-diphenyl-isatin | 0,4 | 1:20 |
| (4,4′-diacetoxy-diphenyl)-(pyridil-2)-methan | 3 | 1:200 |
| Substanz La 25 | 3,2 | 1:53 |
| Substanz La 76 | 1,8 | 1:120 |
| Substanz La 87 | 2,7 | 1:130 |

Publikationen über Phenolphthalein-Intoxikationen Nierenreizung angegeben ist, wurde auf eine Prüfung dieser Substanzen verzichtet.

*Methodik:* Die übrigen Substanzen wurden Ratten in 5facher Wirkungsdosis 5 Tage lang mit der Schlundsonde verabreicht. Stuhl und Urin wurden gesondert aufgefangen und der Urin mehrmals täglich auf Eiweiß untersucht.

*Ergebnisse:* Nach Diacetoxy-diphenyl-isatin war vom 3. Tag, bei La 25 vom 4. Tage an eine deutliche Eiweißausscheidung bei sämtlichen Versuchstieren vorhanden. Dagegen trat nach La 76 und La 87 keine Eiweißausscheidung auf.

*c) Toxicität bei abgebundenem Darm.* Nach Einnahme von Abführmitteln besteht die Möglichkeit, daß die therapeutische Dosis, auch mehrmals eingenommen, wirkungslos bleibt. Es wurde versucht, im Tierexperiment solche Verhältnisse herzustellen.

Dazu wurde die von mir beschriebene Methodik mit abgebundenem Dünn- und Dickdarm verwendet[13]. Pro Substanz wurde bei 30 Tieren der Dünndarm und bei 30 Tieren der Dickdarm abgebunden. Sie erhielten jeweils die doppelte Wirkungsdosis der Substanzen. Als Kriterium für die Toxicität diente die Anzahl der überlebenden Ratten am 5. Tag.

*Ergebnisse:* Siehe Abb. 4 und 5.

### *2. Chronische Toxicität.*

*a) Methodik:* Die Ratten kamen in Einzelkäfige und wurden einheitlich ernährt. Jedes Tier erhielt täglich die doppelte Wirkungsdosis der Prüfsubstanz dem Futter zugemischt. Die Futtermenge war so bemessen, daß sie mit Sicherheit innerhalb von 24 Std verzehrt wurde. Pro Substanz wurden 6 Versuche durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug 3 Monate. Gleichzeitig wurden entsprechend ernährte Kontrollratten ohne Laxansmedikation in Versuch genommen. Nach Ablauf von 3 Monaten

kamen Dünndarm, Dickdarm, Leber, Milz und Nieren zur pathologisch-histologischen Untersuchung.

*Ergebnisse:* Im folgenden beschränken wir uns auf die Aufzählung pathologischer Befunde; Organe, die nicht erwähnt sind, zeigten keine Veränderungen.

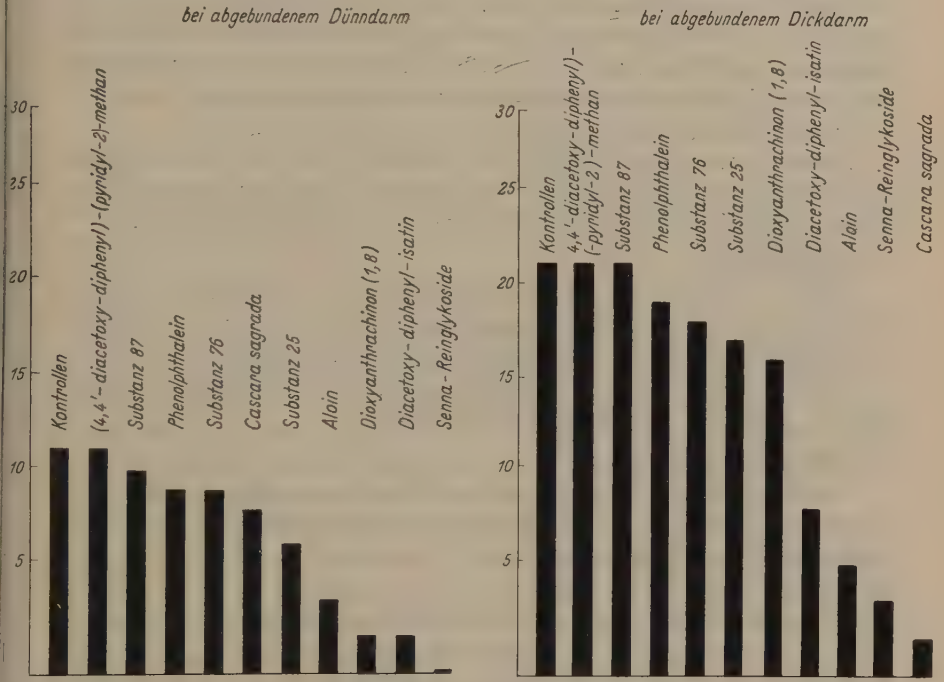



Abb. 4 u. 5. Zahl der überlebenden Ratten am 5. Tag.

*Aloin.*

Niere: In den Tubuli einzelne, eosingefärbte Zylinder als Ausdruck einer Nierenreizung.

Leber: An zahlreichen Stellen innerhalb des Läppchengefüges Ansammlung von Rundzellen, die die benachbarten Epithelien verdrängen. Protoplasma der peripheren Zellen fein gekörnt = feintropfige Verfettung.

*Cascara sagrada.*

Niere: In den ableitenden Harnkanälchen einzelne eosingefärbte Niederschläge = Nierenreizung.

Leber: Feingekörntes Protoplasma der peripheren Zellen = feintropfige Verfettung.

*1,8-Dioxyanthrachinon.*

Niere: Teilweise eosingefärbte Niederschläge, in den Kanälchen vereinzelt Zylinder = Nierenreizung.

*Senna-Reinglykoside.*

Niere: Glomeruli zellarm, Capillarwand an einzelnen Stellen stark verdickt, in den Zwischenstücken massive Epithelnekrosen. Auch Epithelzellen der Henleschen Schleife pyknotisch verändert. Zahlreiche Kanälchen sind ihrer Epithelien völlig entkleidet. In den Hauptstücken nur geringe Veränderungen. Capillaren prall mit Erythrocyten gefüllt = nekrotisierende Nephrose, vorwiegend der Zwischenstücke.

Leber: Ganze Leberläppchen sind nekrotisch, andere Bezirke zeigen nur vereinzelt Epithelnekrosen. Ein Teil der Läppchenperipherie zeigt erhebliche Verfettung = partiell nekrotisierende Leberschädigung.

*Phenolphthalein.*

Niere: In einzelnen Nephronabschnitten Niederschläge = abgestoßenes Epithel, auch am äußeren Rande der Bowmannschen Kapsel derartige Niederschläge. Epithelnekrosen nicht nachweisbar.

Leber: In der Läppchenperipherie deutliche Verfettung = geringgradige, periphere Verfettung der Leberzellen.

*Diacetoxy-diphenyl-isatin.*

Niere: In den ableitenden Harnkanälchen massive Eiweißfällung, in zahlreichen Zellen abgestoßenes und nekrotisierendes Epithel = Veränderungen im Sinne einer Nephrose.

*La 25.*

Niere: In den ableitenden Harnkanälchen teilweise massive Eiweißausfällung und abgestoßenes Epithel = Veränderungen im Sinne einer Nephrose.

*La 76.* Kein pathologischer Befund.

*La 87.* Kein pathologischer Befund*.

*b) Blutveränderungen.* In einer weiteren Versuchsserie wurden je 3 Tiere pro Substanz in der gleichen Weise behandelt wie bei der chronischen Toxicität beschrieben. Von diesen Tieren wurde wöchentlich ein Blutbild angefertigt. Die Dauer dieser Versuche betrug ebenfalls 3 Monate.

*Ergebnisse:* Cascara sagrada, 1,8-Dioxyanthrachinon, Senna-Reinglykoside, Phenolphthalein, La 25, La 76 und La 87 bewirkten keinerlei Veränderungen im Blutbild. Diacetoxy-diphenyl-isatin führte nach 3 Wochen zu einer erheblichen Vermehrung der segmentkernigen Leukocyten, außerdem traten ab der 3. Woche außergewöhnlich viel Lympho-

* Ich danke Herrn Professor Büchner und Herrn Dr. Könn (Pathologisches Institut Freiburg/Br.) für die Hilfe bei der Diagnose der pathologisch-histologischen Präparate.

cyten auf. Die mit Aloin behandelten Versuchstiere wiesen nach 4 bis 6 Wochen einen erheblichen Rückgang der Erythrocyten und eine deutliche Hb-Abnahme auf.

*c) Einfluß auf die Schwangerschaft. Methodik:* Da von den Laxantien immer wieder gesagt wird, sie könnten zu Fehlgeburten führen, wurden sämtliche Laxantien an gravide Ratten für die Dauer der Schwangerschaft verabreicht. Pro Substanz wurden 3 Versuche durchgeführt und die Laxantien in doppelter Wirkungsdosis dem Futter beigemengt.

*Ergebnisse:* Sämtliche Versuchstiere brachten normale Junge zur Welt; Früh- oder Fehlgeburten traten nicht auf.

**Besprechung der Befunde.**

Bisher wurden zur Prüfung der Abführmittel Katzen oder weiße Mäuse verwendet (in Amerika neuerdings Rhesusaffen). Im Verlaufe der vorliegenden Untersuchungen erwiesen sich Ratten als besonders geeignete Versuchstiere, da sämtliche Abführmittel, auch Phenolphthalein, bei ihnen wirken.

Durch die Verwendung von Ratten konnten wesentliche Parallelen zwischen Wirkungsdosis und Wirkungseintritt im Vergleich zum Menschen festgestellt werden. Hier gilt die Regel, daß diejenige Dosis, die pro kg Ratte eine abführende Wirkung erzeugt, *als therapeutische Dosis für den erwachsenen Menschen* genügt. Die Gültigkeit dieser Regel wurde durch Selbstversuche auch für die neuen Substanzen bestätigt.

Der Wirkungseintritt war bei Verabreichung des gleichen Laxans an Mensch und Ratte prozentual gleich beschleunigt (siehe Tab. 2). Zum Beispiel war nach Applikation von Diacetoxy-diphenyl-isatin die Zeit bis zur Absetzung gefärbten Stuhles auf $^1/_4$ gegenüber der Normalzeit verkürzt. Wird die normale Entleerungszeit beim Menschen mit etwa 30 Std angenommen, so dürfte die Wirkung nach Diacetoxy-diphenyl-isatin nach etwa 7—8 Std eintreten. Selbstversuche bestätigten diese Annahme.

Für Anthrachinonderivate hat diese Regel keine Gültigkeit. Sie führen bei Ratten lediglich zum Absetzen ungeformten Stuhles, ohne daß die Entleerung gegenüber der Norm beschleunigt ist. Das erklärt sich wohl dadurch, daß die Anthrachinonglykoside erst nach Aufspaltung zu den Aglukonen laxierend wirken, und daß diese Aufspaltung bei der Ratte langsamer vor sich geht als beim Menschen.

Die Wirkung der Anthrachinonderivate erstreckt sich vorwiegend auf den Dickdarm, wie Lenz beweisen konnte. Unklarheit bestand bisher über die Wirkung der synthetischen Laxantien. Hier gaben die Versuche am isolierten Darm einen Hinweis, daß der Dickdarm durch die synthetischen Stoffe stärker angeregt wird als der Dünndarm. Durchströmungsversuche am Darm in situ liefern den Beweis für ihre überwiegende Dickdarmwirksamkeit. In gleicher Richtung weisen die Entleerungsversuche mit Tusche als Kontraststoff: Der Dickdarm ist nur selten mit

Tusche gefüllt, dagegen finden sich im Dünndarm stets massive Tuschemengen. Im Dickdarm von Tieren, die nur mit Tusche ohne Laxanszugabe behandelt wurden, sind angefärbte Kotballen die Regel.

Sämtliche synthetischen Laxantien übten auch eine geringe Wirkung auf den Dünndarm aus, jedoch ist diese Wirkung, gemessen an der Dickdarmwirkung, zu gering, um praktisch eine Rolle zu spielen. Da Lenz auch eine geringgradige Wirkung der Anthrachinonderivate auf den Dünndarm feststellen konnte, dürften sämtliche bekannten Laxantien zwar vorwiegend auf den Dickdarm wirken, stets aber auch in geringem Grad auf den Dünndarm.

Im Gegensatz zu den Untersuchern, die eine Anthrachinonwirkung durch direkten Kontakt mit der Darmschleimhaut beschreiben (Lenz, Magnus, Schmid) stellte Straub[16, 18] die Theorie auf, die Reinglykoside von Senna würden nach Resorption im Dünndarm durch Wiederausscheidung in den Dickdarm wirken. Hierbei soll im Blut eine Spaltung der Glykoside zu Aglykonen stattfinden.

Für die Ansicht Straubs spricht die Tatsache, daß die Dosis von Anthrachinonderivaten, die nach subcutaner Injektion abführend wirkt, in der gleichen Größenordnung liegt, wie die orale Wirkungsdosis. Ebenso spricht für die Theorie Straubs der Befund, nach dem die Anthrachinonderivate im Gegensatz zu den synthetischen Laxantien auch dann noch abführten, wenn der Dünndarm unterbunden worden war.

Entgegen der Theorie Straubs konnte Schmid[12] die Hydrolyse der Anthraglykoside zu Aglukonen durch *Darmbakterien* beweisen. Er führt die Wirkung der Anthrachinone auf direkten Kontakt mit der Darmschleimhaut zurück. Straubs Theorie steht außerdem im Widerspruch zu den Beobachtungen von Lenz[3], der 1. nach Behandlung der Dickdarmschleimhaut mit Lokalanaesthetica keine Abführwirkung durch Senna mehr sah und 2. auch durch Anthrachinonklysmen Abführwirkung feststellte.

Nach Analyse dieser gegensätzlichen Befunde soll der Versuch gemacht werden, beide Theorien — Wirkung nach Resorption oder durch Kontakt mit der Darmschleimhaut — zu vereinigen. Für eine solche Kombination sprechen die Beobachtungen am Menschen. Der Wirkungseintritt erfolgt bei Anthrachinonmedikation am Menschen nach etwa der gleichen Zeit wie nach Einnahme von Diacetoxy-diphenyl-isatin oder (4,4′-diacetoxy-diphenyl)-(pyridyl-2)-methan. Während aber bei Gebrauch synthetischer Abführmittel nur eine 1—2malige Entleerung erfolgt, führen Anthrachinonderivate zu einer wesentlich länger anhaltenden Wirkung mit zahlreichen Entleerungen. Somit ist die Theorie zu vertreten, daß Anthrachinonderivate zunächst in Form der Aglukone durch Kontakt mit der Darmschleimhaut wirken, aber eine zusätzliche

und länger anhaltende Wirkung durch die resorbierten und in den Dickdarm ausgeschiedenen Aglukone zustande kommt.

Demgegenüber ist die Wirkungsweise der synthetischen Laxantien klar: Sie wirken nur durch Kontakt mit der Darmschleimhaut. Bereits Vamossy[19] konnte den größten Teil des verabreichten Phenolphthaleins unverändert im Stuhl nachweisen. Ebenso werden Diacetoxy-diphenyl-isatin und (4,4'-diacetoxy-diphenyl)-(pyridil-2)-methan quantitativ im Stuhl wieder ausgeschieden (Sanders, Baum u. Straub[11] und Schmidt[13]. Da auch die subcutan verabreichten Wirkungsdosen unverhältnismäßig viel höher lagen als die oralen, ist es erwiesen, daß diese synthetischen Stoffe ihre Wirkung keinesfalls auf resorptivem Wege entfalten.

Abführmittel können toxische Nebenwirkungen haben und verhalten sich hinsichtlich ihrer Toxicität nicht gleich.

Die bei sämtlichen Laxantien verhältnismäßig hohen akut toxischen Dosen brauchen praktisch kaum in Betracht gezogen zu werden. Trotzdem sei auf die starke Eiweißausscheidung im Urin hingewiesen, die nach höheren Dosen von Diacetoxy-diphenyl-isatin und La 25 beobachtet wurde. Die Gefahr bei der Einnahme von Abführmitteln liegt, nach eventuell mehrmaliger Unwirksamkeit, in einer Ansammlung größerer Mengen des Mittels im Darm. In solchen, auch schon beschriebenen Fällen[2] kann es auch durch Stoffe, die in normaler Dosierung harmlos sind, zu Intoxikationen kommen.

Die Versuche mit abgebundenem Dünn- und Dickdarm lieferten dafür den Beweis: Sämtliche Anthrachinonderivate übertreffen hinsichtlich der Toxicität die synthetischen Substanzen, außer Diacetoxy-diphenyl-isatin. Die verhältnismäßig hohe Toxicität dieser Substanz war unerwartet, zumal Sanders, Baum u. Straub[11] bis zu 98% des verabreichten Diacetoxy-diphenyl-isatins im Stuhl nachweisen konnten. Die Versuche mit chronischer Applikation dieses Stoffes lassen vermuten, daß Diacetoxy-diphenyl-isatin bis zu einem gewissen Grade resorbiert wird. Die zweifellos geringen resorbierten Mengen reichen aus, um Organschädigungen hervorzurufen. Ebenso ist die Substanz La 25 verhältnismäßig toxisch und kommt für eine Anwendung beim Menschen nicht in Betracht. Überraschend gering sind die Schädigungen durch Phenolphthalein, wenn man sie mit denen vergleicht, die etwa durch Anthrachinonderivate auftreten. Praktisch untoxisch waren die beiden neuen Substanzen La 76 und La 87. Hinweise über die Brauchbarkeit der einzelnen Laxantien liefert die Tab. 4 in der die therapeutischen Breiten verschiedener Stoffe festgehalten sind.

In dieser Tabelle wurde die Wirkungsdosis mit der Verträglichkeitsdosis in Beziehung gesetzt, da eine Bestimmung der DL 50 bei Laxantien praktisch unmöglich war.

Die Versuche, in deren Verlauf kein Einfluß der Laxantien auf die Gravidität der Ratte festzustellen war, sind nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen.

## Zusammenfassung.

Die laxierenden Substanzen Aloin, Cascara sagrada, 1,8-Dioxyanthrachinon, Senna-Reinglykoside, Phenolphthalein, Diacetoxy-diphenyl-isatin, 4,4′-dioxy-triphenyl-methan, (4,4′-dioxy-diphenyl-)-(6-methyl-pyridyl-2)-methan, und (4,4′-dioxy-diphenyl)-(chinolyl-2)-methyl-methan wurden vergleichend pharmakologisch und toxikologisch untersucht.

1. Die Ratte ist ein geeignetes Versuchstier zur Wertbestimmung von Laxantien. Für die synthetischen Laxantien lassen sich Beziehungen zwischen Wirkungsdosis und Wirkungseintritt bei Mensch und Ratte feststellen.

2. Sämtliche geprüften Stoffe haben ihren Hauptwirkungsort im Dickdarm. Alle wirken jedoch in geringem Maße auch dünndarmanregend.

3. Diacetoxy-diphenyl-isatin, Phenolphthalein, 4,4′-dioxy-triphenyl-methan, (4,4′-dioxy-diphenyl)-(6-methyl-pyridyl-2)-methan und (4,4′-dioxy-diphenyl)-(chinolyl-2)-methyl-methan wirken durch Kontakt mit der Darmschleimhaut. Die Anthrachinonderivate wirken nach Aufspaltung zu Aglukonen sowohl durch Berührung mit der Darmschleimhaut als auch durch Resorption und Wiederausscheidung in das Colon.

4. Die Mehrzahl der Abführmittel hat akute und chronische toxische Wirkungen. Die therapeutische Breite der synthetischen Substanzen außer Diacetoxy-diphenyl-isatin ist größer als die der Anthrachinonderivate.

## Literatur.

[1] Führer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **105**, 249—263 (1925). — [2] Fürbringer: Dtsch. med. Wschr. **1917**, 842—844. — [3] Lenz, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **28**, 75—157 (1923). — [4] Lenz, E.: Schweiz. med. Wschr. **1923**, 887—893. — [5] Lenz, E.: Schweiz. med. Wschr. **1923**, 912—916. — [6] Lenz, E.: Schweiz. med. Wschr. **1923**, 935—938. — [7] Loewe, S., u. G. Faure: Arch. exper. Path. u. Pharm. **107**, 271—286 (1925). — [8] Loewe, S., u. I. A. Loewe: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 254—264 (1949). — [9] Magnus, R.: Verh. 29. Kongr. Ges. inn. Med. Wiesbd. 43 (1912). — [10] Oettel, H.: zit. n. Führer, H.: Vergiftungsfälle **5**, 73 (1934). — [11] Sanders, R. G., H. M. Baum u. G. J. Straub: J. Pharm. Ass. Sci. Ed. **40**, 340—341 (1951). — [12] Schmid, W.: Arzneimittel-Forsch. **2**, 6—20 (1952). — [13] Schmidt, L.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 19—23 (1953). — [14] Starkenstein, Rost u. Pohl: Toxikologie, S. 118. — [15] Straub, W., u. E. Triendl: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 518—527 (1934). — [16] Straub, W., u. E. Triendl: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 528—535 (1934). — [17] Straub, W., u. H. Gebhardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 399—407 (1936). — [18] Straub, W., u. E. Triendl: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **185**, 1—19 (1937). — [19] Vamossy, Z. v.: Ther. Gegenw. **1902**, 201—202.

Dozent Dr. Ludwig Schmidt, Freiburg/Br., Katharinenstr. 29.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 219—224 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

# Der Einfluß des Glucose-Dehydrogenasesystems aus Rinderleber auf Oestron und Oestradiol-17$\beta$.

Von
K. Repke.

*(Eingegangen am 25. April 1955.)*

Die Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17 $\beta$[1] ist unter biologischen Verhältnissen wahrscheinlich ausschließlich ein fermentativer Prozeß. Jedenfalls spielen dabei die biologischen Reduktionsmittel, die unter der Bezeichnung Sulfhydrylkörper zusammengefaßt werden, offenbar keine Rolle (Repke u. Markwardt 1954a). Nach den bisherigen Untersuchungen scheinen die Bernsteinsäure-Dehydrogenase und die wasserstoffübertragenden Fermente der Gärung und Glykolyse unbeteiligt zu sein. Dagegen konnte der Nachweis geführt werden, daß das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem zu dieser Reduktion fähig ist (Repke u. Markwardt 1954b, Markwardt u. Repke). — Der Dehydrierungsmechanismus von Glucose-6-phosphat durch „Zwischenferment" ist offenbar ähnlich dem von Glucose durch Glucose-Dehydrogenase; darüberhinaus liegt in beiden Systemen das Gleichgewicht ganz auf der Seite der Dehydrierung der genannten Substrate (Strecker u. Korkes). Die sich daraus ergebende Vermutung, daß auch das Glucose-Dehydrogenasesystem zur Oestronreduktion fähig ist, bildet den Ausgangspunkt der nachfolgenden Untersuchung.

Die Glucose-Dehydrogenase ist von Harrison in der Leber verschiedener Tiere nachgewiesen worden. Untersuchungen mit diesem Ferment erschienen auch deswegen aussichtsreich, weil einige Untersucher nachgewiesen haben, daß Lebergewebe zugesetztes Oestron teilweise in Oestradiol-17 $\beta$ umsetzen kann (Heller, Pincus, Ryan u. Engel). Allerdings wird von der Leber auch der umgekehrte Prozeß zustandegebracht (Pearlman u. De Meio, Lieberman u. Mitarb., Ryan u. Engel).

In diesem Zusammenhang sind einige Arbeiten wichtig, welche sich mit der Inaktivierung des Oestradiols in der Leber befassen, bei der offenbar auch Oestron gebildet wird. Danach scheint die hitzestabile Komponente des inaktivierenden Enzymsystems die Co-Zymase zu sein (De Meio u. Mitarb., Coppedge u. Mitarb.). Weiter soll an dem Prozeß der Inaktivierung eine Dehydrogenase beteiligt sein. Das wird aus der Beobachtung erschlossen, daß Leberschnitte oder Leberextrakte Oestradiol in Stickstoffatmosphäre nur dann inaktivierten, wenn dem Ansatz Methylenblau als Wasserstoffacceptor zugesetzt worden war (De Meio u. Mitarb., Ledogar u. Jones).

[1] Nach der Nomenklatur von L. F. u. M. Fieser.

Genauere Feststellungen über die Natur der Fermente, welche bei der wechselseitigen Umwandlung der beiden Oestrogene in der Leber eine Rolle spielen, scheinen bisher nicht getroffen zu sein. In der vorliegenden Arbeit wird die Frage geprüft, ob an den Prozessen Oestron $\rightleftarrows$ Oestradiol-17 $\beta$ das Glucose-Dehydrogenasesystem beteiligt sein kann.

## Methoden und Materialien.

*Präparation von Ferment und Coferment.* Die Präparation wurde im wesentlichen nach den Angaben von Harrison durchgeführt, doch wurden auch einige Modifikationen von Strecker und Korkes übernommen. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen. Alle Arbeitsgänge wurden soweit als möglich im Kälteraum bei 5° C ausgeführt. 200 g ganz frische, gesunde Leber vom Rind wurden nach Zusatz von 200 cm³ eiskalten Acetons 2—3 min in einem Homogenisator zerkleinert. Es wurde darauf geachtet, daß sich das Homogenisiergut dabei nicht über 15° C erwärmt. Die Acetonsuspension wurde in 2 Liter eiskalten Acetons eingegossen und nach kräftigem Umrühren das Aceton abgenutscht. Der erhaltene Leberkuchen wurde nochmals der gleichen Behandlung unterworfen, doch diesmal die zerkleinerte Leber so trocken wie möglich gesaugt. Der Leberkuchen wurde bei Zimmertemperatur aufgebrochen und durch Reiben zwischen den Handflächen völlig getrocknet. Das gewonnene Leberpulver (durchschnittlich 50 g) wurde 30 min mit dem 10fachen Volumen destillierten Wassers bei 20° C gerührt. Die Suspension wurde durch zwei Lagen Mull gegossen und das ungelöste, auf dem Mull haftende Material in gleicher Weise nochmals extrahiert und abgetrennt. Die vereinigten, fein suspendiertes Material enthaltenden Lösungen wurden durch Zusatz von Salzsäure auf $p_H$ 6 gebracht und die entstehende Eiweißfällung abzentrifugiert. Die gewonnene, klare Lösung wurde mit Natronlauge auf $p_H$ 7 gebracht und anschließend mit Ammonsulfat gesättigt. Die entstehende Fällung wurde auf der Nutsche abgefiltert und die Hälfte davon zur Präparation des *Ferments* weiterbenutzt. Dieser Teil des Präcipitats wurde in 750 cm³ destillierten Wassers gelöst und 3—4 Std gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde in 5 Liter einer $^3/_4$gesättigten Ammonsulfatlösung eingegossen. Das entstehende Präcipitat wurde entweder auf der Nutsche abgefiltert (bis die Lösung klar ablief) oder abzentrifugiert (6000 U/min). Der Niederschlag wurde in Phosphatpuffer $p_H$ 9 aufgenommen und die Lösung klarzentrifugiert. Die erhaltene Fermentlösung ($p_H$ bei 6,5) wurde für die Versuche verwandt. Der nicht benötigte Rest wurde im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Im trockenen Zustand bei 0° C aufbewahrt verlor das Ferment nur relativ langsam an Aktivität und konnte noch 3 Wochen nach der Präparation mit Erfolg benutzt werden. In der Regel wurden jedoch frische Fermentpräparate verwandt. — Für die Bereitung des *Coferments* wurde die andere Hälfte des ersten Ammonsulfatpräcipitats in 200 cm³ destillierten Wassers aufgenommen und die Lösung mit Ammonsulfat gesättigt. Die entstehende Fällung wurde auf der Nutsche abgefiltert und dann in Phosphatpuffer $p_H$ 9 gelöst. Die Lösung wurde auf dem kochenden Wasserbad 5 min unter Umrühren erhitzt. Die entstandenen Eiweißcoagulate wurden auf einer kleinen Nutsche abgefiltert und mit heißem Phosphatpuffer gewaschen. Das klare Filtrat stellte die für die Versuche benutzte Cofermentlösung dar ($p_H$ bei 6). Der nichtverbrauchte Rest wurde im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet. — Die Aktivität des Fermentsystems wurde mit Hilfe von Triphenyltetrazoliumchlorid als Reduktionsindicator kontrolliert. Die gebildete Formazanmenge wurde colorimetrisch bestimmt. Bei brauchbaren Präparaten erhält man 200—300 $\gamma$ Formazan/60 min, wenn sich der Testansatz zusammensetzt, wie in Tab. 2 angegeben, und im Vakuum bei 37° inkubiert wird.

*Versuchsansätze.* Die Oestrogene wurden in konzentrierter alkoholischer Lösung einpipettiert, so daß auf den einzelnen Ansatz nur 0,06 cm³ Alkohol entfielen. Die benutzten Reinsubstanzen Oestron, Oestronacetat und Oestradiol-17 $\beta$ wurden von der Schering-AG zur Verfügung gestellt[1]. Die Herstellung der Standardlösungen wurde nach den Angaben von Behrens, Heubner, Koll und Külz vorgenommen. — Das Volumen der Ferment- und Cofermentlösungen im Ansatz wurde so bemessen, daß die einpipettierte Menge an Ferment und Coferment dem extrahierten Inhalt von 8—10 g Leber entsprach. Zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedlung enthielten die Ansätze je 0,5 mg Penicillin und Streptomycin. Die Inkubation wurde in verschlossenem 50 cm³-Kölbchen bei 37,5° C (Wasserbad) vorgenommen.

*Auswertung.* Die Extraktion der Oestrogene aus den Ansätzen wurde mit Alkohol vorgenommen (siehe bei Repke u. Markwardt 1954b). Sie ist praktisch verlustlos (vgl. Versuchsbeispiel 4 in Tab. 1). Als Bestimmungsmethode für die Oestrogene diente der Allen-Doisy-Test. Oestradiol-17 $\beta$ wird bei diesem Test dadurch von Oestron unterschieden, daß es etwa 8—10mal stärker wirksam ist. Die geübte Technik ist in vorangehenden Mitteilungen beschrieben (Repke u. Markwardt 1954a, b).

## Versuchsergebnisse.

Nach Inkubation von *Oestron* mit dem Glucose-Dehydrogenasesystem wurde gefunden, daß die Extrakte eine stärkere oestrogene Wirksamkeit besitzen als der eingewogenen Oestronmenge entspricht. Die Auswertung im Allen-Doisy-Test ergab unter geeigneten Versuchsbedingungen Ausschläge von derselben Größe wie bei einer gleichgroßen Menge Oestradiol-17 $\beta$ (vgl. die Versuchsbeispiele 1, 3 und 5 in Tab. 1). Da keins der bekannten Oestronderivate sonst eine entsprechende oestrogene Wirksamkeit besitzt, darf angenommen werden, daß das untersuchte Fermentsystem Oestron quantitativ zu Oestradiol-17 $\beta$ reduziert. Bei guten Fermentpräparaten war die Umsetzung in spätestens 3 Std beendet (vgl. Versuchsbeispiel 1). Um sicher zu gehen, wurde jedoch meist eine längere Inkubationszeit gewählt. Durch Zusatz von Methylenblau als konkurrierenden Wasserstoffacceptor wurde die Reduktion nicht beeinträchtigt (vgl. Versuchsbeispiel 6).

Bei unseren schon zitierten Untersuchungen mit dem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem hatten wir die Erfahrung gemacht, daß bei der Präparation des Ferments leicht ein für die Oestronreduktion notwendiger Wasserstoffüberträger verlorengeht. Im Hinblick auf diese Erfahrung wurde in der vorliegenden Arbeit von vornherein ein relativ rohes Präparat der Glucose-Dehydrogenase benutzt, in dem eine solche Komponente des Fermentsystems noch enthalten sein mußte. Die Schlüssigkeit der mit diesem Präparat erhaltenen Ergebnisse wurde durch die Feststellung gesichert, daß bei Weglassen von Glucose oder von Coferment aus dem System die Oestronreduktion ausbleibt (vgl. Versuchsbeispiel 2). Sulfhydrylgruppen spielen in dem System keine Rolle, denn

[1] Auch an dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Junkmann für seine freundliche Hilfe danken.

*Tabelle 1.*

| Versuchsbeispiel | Ansatz (Die angegebenen Ferment- und Cofermentmengen entsprechen dem extrahierten Inhalt von 8—10 g Leber.) | Eingewogene Oestrogendosis pro Tier $\gamma$ | Prozentsatz oestrischer Tiere % |
|---|---|---|---|
| 1 | 30 $\gamma$ Oestron, 4 cm³ Fermentlösung, 2 cm³ Cofermentlösung, 0,1 cm³ 0,3 m Glucose. Inkubation: 0 Std | 0,45 | 10 |
| | desgl., Inkubation: 3 Std | 0,45 | 96 |
| | desgl., Inkubation: 6 Std | 0,45 | 98 |
| | 30 $\gamma$ Oestradiol-17 $\beta$ | 0,45 | 94 |
| 2 | 30 $\gamma$ Oestron | 0,45 | 20 |
| | 30 $\gamma$ Oestron, 6 cm³ Fermentlösung, 3 cm³ Wasser, 0,5 cm³ 0,3 m Glucose. Inkubation: 13 Std | 0,45 | 22 |
| | desgl., statt Wasser 3 cm³ Cofermentlösung, statt Glucose 0,5 cm³ Wasser | 0,45 | 39 |
| | desgl., statt Wasser 0,5 cm³ 0,3 m Glucose | 0,45 | 64 |
| 3 | 30 $\gamma$ Oestron, 5 cm³ Fermentlösung mit $4 \times 10^{-4}$ m p-Chloromercuribenzoat, 2,5 cm³ Wasser. Inkubation: 11 Std | 0,45 | 30 |
| | desgl., mit 0,5 cm³ 0,3 m Glucose, 2 cm³ Wasser | 0,45 | 30 |
| | desgl., mit 2 cm³ Coferment statt Wasser | 0,45 | 76 |
| | 30 $\gamma$ Oestradiol-17 $\beta$ | 0,45 | 80 |
| 4 | 34,8 $\gamma$ Oestronacetat | 0,522 | 10 |
| | 34,8 $\gamma$ Oestronacetat, 5 cm³ Fermentlösung, 5 cm³ Cofermentlösung, 0,1 cm³ 0,3 m Glucose. Inkubation: 0 Std | 0,522 | 16 |
| | desgl., Inkubation: 6 Std | 0,522 | 86 |
| | desgl., mit $4 \times 10^{-4}$ m p-Chloromercuribenzoat. Inkubation: 6 Std | 0,522 | 88 |
| 5 | 30 $\gamma$ Oestron | 0,45 | 20 |
| | 30 $\gamma$ Oestron, 5 cm³ Fermentlösung, 3 cm³ Cofermentlösung, 0,1 cm³ 0,3 m Glucose. Inkubation: 12 Std | 0,45 | 96 |
| | desgl., statt Oestron 30 $\gamma$ Oestradiol-17 $\beta$ | 0,45 | 90 |
| | 30 $\gamma$ Oestradiol-17 $\beta$ | 0,45 | 94 |
| 6 | 30 $\gamma$ Oestron, 4 cm³ Fermentlösung, 4 cm³ Cofermentlösung, 0,1 cm³ 0,3 m Glucose, 0,1 cm³ Wasser. Inkubation: 11 Std | 0,45 | 94 |
| | desgl., statt Wasser 0,1 cm³ 0,1%iges Methylenblau | 0,45 | 88 |
| | 30 $\gamma$ Oestradiol-17 $\beta$, 4 cm³ Fermentlösung, 4 cm³ Cofermentlösung, 0,1 cm³ 0,3 m Glucose, 0,1 cm³ Wasser. Inkubation: 11 Std | 0,45 | 84 |
| | desgl., statt Wasser 0,1 cm³ 0,1%iges Methylenblau | 0,45 | 96 |

das SH-Reagenz p-Chloromercuribenzoat blieb auch nach 20 minütiger Vorinkubation mit dem Ferment ohne Einfluß auf die untersuchte Umsetzung (vgl. Versuchsbeispiel 3 u. 4). *Oestronacetat* verhielt sich gegenüber dem Glucose-Dehydrogenasesystem wie Oestron (vgl. Versuchsbeispiel 4).

Auf Grund der beschriebenen Versuchsresultate darf als gesichert gelten, daß das Glucose-Dehydrogenasesystem Oestron zu Oestradiol-17$\beta$ zu reduzieren vermag. Beurteilt nach der Auswertung im Allen-Doisy-Test verlief die Reduktion unter geeigneten Bedingungen quantitativ.

Schon auf Grund dieser Tatsache konnte vermutet werden, daß das System die Umsetzung nicht auch rückläufig zu beeinflussen vermag. Tatsächlich wurde nach Inkubation von *Oestradiol*-17 $\beta$ mit dem vollständigen Glucose-Dehydrogenasesystem immer die eingesetzte Oestrogenmenge wiedergefunden (vgl. Versuchsbeispiel 5). Oestradiol-17 $\beta$ diente auch dann nicht als Substrat (Wasserstoffdonator), wenn aus dem System das eigentliche Substrat, nämlich Glucose, fortgelassen und Methylenblau als Wasserstoffacceptor zugesetzt wurde (vgl. Versuchsbeispiel 6). — Gemessen an der Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) wird das Glucose-Dehydrogenasesystem durch Oestron und Oestradiol-17 $\beta$ geringfügig in seiner Aktivität gehemmt (vgl. Tab. 2).

*Tabelle 2.*

| Ansatz (Die angegebene Ferment- und Cofermentmenge entspricht dem extrahierten Inhalt von 2 g Leber.) | Formazan in 60 min $\gamma$ | Fermentaktivität % |
|---|---|---|
| 1 cm³ Fermentlösung, 1 cm³ Cofermentlösung, 0,1 cm³ 0,3 m Glucose, 0,5 cm³ 0,1%iges TTC . . . . . | 225 | 100 |
| desgl., mit 1 mg Oestron . . . . . | 200 | 89 |
| desgl., mit 1 mg Oestradiol-17 $\beta$ . . . . . | 185 | 82 |

## Diskussion.

Auf Grund der mitgeteilten Versuchsergebnisse darf angenommen werden, daß das Glucose-Dehydrogenasesystem an der Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17 $\beta$ in der Leber beteiligt ist. Neben dieser Reduktion vermag die Leber auch vergleichbare Umsetzungen an anderen Steroiden zustandezubringen. Beispielsweise werden von diesem Organ reduziert $\Delta$ 4-Androsten-3,17-dion zu Testosteron und Epitestosteron (Clark u. Mitarb.) und Dehydroisoandrosteron zu $\Delta$ 5-Androsten-3($\beta$), 17($\alpha$)-diol (Schneider u. Mason). In allen Fällen handelt es sich um die Überführung der 17-Ketoverbindung in die 17-Hydroxyverbindung. Man kann in Erwägung ziehen, daß auch bei den letztgenannten Umsetzungen das Glucose-Dehydrogenasesystem eine Rolle spielt.

## Zusammenfassung.

In Fortsetzung einer Untersuchungsreihe über die Natur der an der Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17 $\beta$ beteiligten Enzyme wird in

der vorliegenden Arbeit das Verhalten des Glucose-Dehydrogenasesystems aus Rinderleber geprüft. Beurteilt nach der Auswertung im Allen-Doisy-Test ist das untersuchte Fermentsystem fähig, Oestron quantitativ zu Oestradiol-17 $\beta$ zu reduzieren. Sulfhydrylgruppen spielen dabei keine Rolle. Nach Inkubation von Oestradiol-17 $\beta$ mit dem Fermentsystem ist unter verschiedenen Versuchsbedingungen immer nur das eingesetzte Oestrogen wiederzufinden. Das Fermentsystem wird durch Oestron und Oestradiol-17 $\beta$ in seiner Aktivität geringfügig gehemmt.

## Literatur.

Behrens, B., W. Heubner, W. Koll u. F. Külz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **186**, 121 (1937). — Clark, L. C. jr., C. D. Kochakian and J. Lobotsky: J. of. Biol. Chem. **171**, 493 (1947). — Coppedge, R. L., A. Segaloff, H. P. Sarett and A. M. Altschul: J. of. Biol. Chem. **173**, 431 (1948). — J. Clin. Endocrin. **8**, 602 (1948). — De Meio, R. H., A. E. Rakoff, A. Cantarow and K. E. Paschkis: Endocrinology (Springfield, Ill.) **43**, 97 (1948). — Fieser, L. F., and M. Fieser: Natural products related to phenanthrene. New York: Reinhold Publishing Corp. 1949. — Harrison, D. C.: Biochemic. J. **25**, 1016 (1931); **26**, 1295 (1932) u. **27**, 382 (1933). — Heller, C. G.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **24**, 35 (1939); **26**, 619 (1940). — Ledogar, J. A., and H. W. Jones: Science (Lancaster, Pa.) **112**, 536 (1950). — Lieberman, S., H. J. Tagnon and Ph. Schulman: J. Clin. Invest. **31**, 341 (1952). — Markwardt, F., u. K. Repke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 341 (1955). — Pearlman, W. H., and R. H. De Meio: J. of Biol. Chem. **179**, 1141 (1949). — Pincus, G.: The Steroid Hormones. Currents in Biochemical Research, Ed. D. E. Green. New York: Interscience Publishers, Inc., 1946. — Repke, K., u. F. Markwardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 259 (1954a); 271 (1954b). — Ryan, K. J., and L. L. Engel: Endocrinology (Springfield, Ill.) **52**, 277, 287 (1953). — Schneider, J. J., and H. L. Mason: J. of Biol. Chem. **172**, 771 (1948). — Strecker, H. J., and S. Korkes: J. of Biol. Chem. **196**, 769 (1952).

Dozent Dr. K. Repke, z. Zt. Institut für Medizin und Biologie, Abt. Biochemie, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 225—235 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

# Über den Einfluß des Lichts auf ein wasserstoffübertragendes SH-Ferment der Haut.

Von

K. Repke, W. Dau und H. Schönitz.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 25. April 1955.)*

Die Wirkung des Lichts auf Fermente der Haut scheint bisher nur vereinzelt untersucht worden zu sein.

In den dreißiger Jahren sind Wohlgemuth u. Mitarb. dieser Frage nachgegangen. Nach Einwirkung des Sonnenlichts oder der Strahlung einer Höhensonne fanden sie den Gehalt der Haut an Phenolase vermehrt, den an Diastase und Lipase vermindert (Wohlgemuth u. Sugihara) und weiter das Vermögen der Haut zur Milchsäurebildung geschädigt (Wohlgemuth u. Ikebata). In neuerer Zeit haben Flesh u. Rothman wahrscheinlich gemacht, daß das Licht die Tyrosinase der Haut aktiviert und auf diesem Wege die Pigmentbildung einleitet.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß des Lichts auf die Aktivität eines wasserstoffübertragenden Ferments der Haut untersucht. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung schien uns, gleichgültig ob sich der Lichteffekt als Wirksamkeitssteigerung oder als Inaktivierung des Ferments geltend machen sollte, in jedem Fall für das Verständnis der biologischen Lichtwirkungen von Interesse zu sein. Als Untersuchungsobjekt wurde ein sogenanntes SH-Ferment benutzt, dessen Aktivität an das Vorhandensein freier SH-Gruppen gebunden ist (über die Funktion dieser Gruppen siehe bei Barron). Die Aktivität des wasserstoffübertragenden Ferments wurde mit Hilfe des Reduktionsindicators Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)[1] bestimmt, dessen dunkelrote, sauerstoffbeständige Reduktionsstufe Triphenylformazan[1] sich bequem messen läßt. Der Reduktionsort des TTC in der Haut ist vor allem das Stratum basale (Doerr). Die Versuche wurden an fermenthaltigen Extrakten der Cutis (vom Meerschweinchen) und an intakter Haut (isolierte Ohrmuschel des Kaninchens) vorgenommen.

## Methoden und Materialien.

*Fermenthaltige Extrakte der Cutis.* Für die Bereitung solcher Extrakte erwies sich die Bauchhaut junger Meerschweinchen als geeignet, da sich deren zarte Cutis

[1] Die Substanzen verdanken wir Herrn Prof. Kuhn (Heidelberg).

relativ leicht präparieren läßt. Die von soeben getöteten und ausgebluteten Tieren gewonnene Haut wurde im Kältezimmer von Fett und Unterhautbindegewebe möglichst vollständig befreit. Die gewonnene Cutis wurde dann so weit als möglich mit der Schere zerkleinert und mit Hilfe von Glassplittern im Mörser unter Zusatz von isotonischem Phosphatpuffer $p_H$ 7,4 (nach v. Muralt) zu einem Brei verrieben. Auf 1 g Cutis kamen schließlich 3—5 $cm^3$ Pufferlösung. Nach halbstündiger Extraktion bei Zimmertemperatur wurden die gröberen Teile mit der hydraulischen Presse abgetrennt und die letzten ungelösten Partikel abzentrifugiert. Die erhaltene fast farblose, opalescierende Lösung wurde für die Versuche verwandt. Sie reduzierte ohne Zusätze den Reduktionsindicator TTC und enthielt demnach ein vollständiges wasserstoffübertragendes Fermentsystem bestehend aus Substrat, Apoferment, Coferment und gelbem Ferment (vgl. dazu R. Kuhn u. F. Linke). Die Nitroprussidnatrium-Probe wurde darin immer negativ gefunden; die fixen Sulfhydrylkörper der Haut gehen also in nachweisbarem Umfang nicht in die Extrakte über. Bei Versuchen über eine etwaige Steigerung der Fermentwirkung durch Licht wurden weitgehend inaktive Präparate benötigt. Solche Präparate wurden durch Einleiten von Sauerstoff in Fermentlösungen erhalten, die auf $p_H$ 8 gebracht waren. Vor dem Versuch wurden sie wieder auf das Ausgangs-$p_H$ eingestellt. — Die Inkubation des Fermentsystems mit TTC wurde in evakuierten Thunberg-Röhrchen bei 37° C (Wasserbad) vorgenommen. Die Röhrchen enthielten 3 $cm^3$ Fermentlösung, 1 $cm^3$ 0,1%iges TTC und 1 Tropfen Octylalkohol (als Entschäumungsmittel). Das innerhalb 60 min gebildete Formazan wurde colorimetrisch mit dem Pulfrich-Photometer (Carl Zeiß, Jena) unter Verwendung des Filters S 53 (siehe Zeiß-Druckschrift Mess 430 d/IV) bestimmt. Dazu wurde der Farbstoff mit Butanol ausgeschüttelt und die durch Zentrifugieren geklärte Butanollösung benutzt. Die Formazanmenge wurde aus einer Eichkurve abgelesen. Zwischen Farbstoffmenge und optischer Dichte ist eine lineare Beziehung vorhanden. Weiterhin ist die gemessene Farbstoffmenge innerhalb der Beobachtungszeit (1 Std) eine Funktion der vorhandenen Enzymmenge. Die beigegebenen Tabellen enthalten die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Da das Ausmaß der Formazanbildung von Extrakt zu Extrakt wechselt, war bei jedem Versuchsbeispiel der Wert für den jeweiligen Kontrollansatz anzuführen. Der besseren Übersichtlichkeit wegen ist die Fermentaktivität auch in Prozent angegeben. Dabei ist die im zugehörigen Kontrollsatz innerhalb 1 Std gebildete Formazanmenge als 100 gesetzt. Die Fehlergrenze ($P = 0{,}99$) wurde mit 96 und 104% gefunden, was bedeutet, daß in 99 von 100 Prüfungen das Ergebnis größer als 96% und kleiner als 104% des richtigen Ergebnisses ist.

Bei Versuchen über Reaktivierung des Ferments wurde Cystein-HCl (Merck) nach Neutralisation angewandt. Cystein kann unter den gewählten Bedingungen TTC in kleinem Umfang zu Formazan reduzieren. Dessen jeweilige Menge wurde in Ansätzen bestimmt, in denen die aktive durch eine hitzeinaktivierte Fermentlösung ersetzt war. Die dabei gefundenen Werte für die Cysteinreduktion des TTC wurden bei der Auswertung in Abzug gebracht.

*Isolierte Ohrmuschel des Kaninchens.* Jeweils wurden beide Ohrmuscheln weißer Kaninchen unmittelbar nach der Abtrennung verwandt. Nach Abscherung der Haare wurden sie von der Arterie aus mit körperwarm gehaltenen Lösungen durchströmt. Als Durchströmungsflüssigkeit diente ein Gemisch von einem Teil isotonischen Phosphatpuffers mit 5 Teilen physiologischer Kochsalzlösung, das sich zur Herstellung gleichmäßiger Durchströmung bewährte. Bei den einzelnen Versuchsansätzen waren darin gelöst die benutzten Photosensibilisatoren (s. u.), die Fermenthemmstoffe Urethan (2%ig) und Natriumcyanid (0,1%ig, neutralisiert), die SH-Gifte Monojodacetat (0,5%ig) und Alloxan (2%ig), sowie die Testreagentien TTC und Natriumtellurit (beide 0,1%ig). Falls nicht anders angegeben, war das $p_H$ der

Lösung auf 7,4 eingestellt. — Das Formazan, das sich bei Durchströmung von Ohrmuscheln mit der TTC-Lösung bildet, läßt sich schwer vollständig extrahieren. Wir haben daher auf seine photometrische Bestimmung verzichtet. Die Fermentaktivität in der intakten Haut der Ohrmuscheln konnte jedoch mit ausreichender Genauigkeit abgeschätzt werden nach der Intensität der innerhalb einer gewissen Zeit eingetretenen Formazanverfärbung. Dabei wurde zwischen der behandelten und unbehandelten Ohrmuschel desselben Tieres oder zwischen behandeltem und unbehandeltem Teil der gleichen Ohrmuschel verglichen. Bei den Versuchen über die Bedeutung der fixen Sulfhydrylkörper für die TTC-Reduktion in der Haut wurde neben den schon genannten SH-Giften ein Testreagens benötigt, welches eine Bestimmung dieser SH-Gruppen erlaubt. Dafür wurde Natriumtellurit benutzt, das sich schon bei früheren Untersuchungen für diesen Zweck bewährt hatte (Ortmann). (Bei Durchlauf der Telluritlösung durch eine Ohrmuschel wird Tellurit durch die fixen SH-Körper zu metallischem Tellur reduziert. Die Intensität der dabei auftretenden, grauschwarzen Verfärbung diente als Vergleichsmaß für den Gehalt der Ohrmuscheln an frei reagierenden, fixen Sulfhydrylkörpern.)

*Belichtung.* Als Strahlungsquelle diente eine gewöhnliche Glühbirne (500 W, 220 V) oder eine mit Gleichstrom betriebene Quecksilberdampflampe (2,5 A, 220 V) mit Hochdruckentladung (etwa 1 atü) und Kippzündung. Die emittierten Linien der benutzten Quecksilberdampflampe reichen nach Angaben der Herstellerfirma bis ins kurzwellige UV (Linien 239, 248, 254, 265, 289 u. 296 m$\mu$), doch liegt beim Ultraviolett die Hauptemission im langwelligen Teil (Linien 302, 313, 334 u. 365 m$\mu$). Das in einem Teil der Versuche benutzte 2,5 mm starke Filterglas UG2 (vgl. Filterkatalog Nr. 7358 der Fa. Schott u. Gen., Jena) läßt praktisch nur langwelliges UV durch. Die Durchlässigkeit beträgt bei 296 m$\mu$ 1,5%, bei 302 m$\mu$ 2,5%, bei 313 m$\mu$ 16%, bei 334 m$\mu$ 56%, bei 365 m$\mu$ 67% und bei 407 m$\mu$ weniger als 0,01%. Der Abstand der beiden Strahlungsquellen vom Objekt betrug immer 15 cm. Die angewandten Strahlungsdosen konnten nicht gemessen werden, doch geben die angeführten technischen Daten und die im Versuchsteil angegebenen Bestrahlungszeiten einen ungefähren Anhalt für Vergleiche. — Die Belichtung der fermenthaltigen Extrakte wurde in der von Wels beschriebenen Apparatur vorgenommen, welche eine gleichmäßige Bestrahlung der Ansätze gewährleistet und Wärmeeffekte ausschließt. Bei einem Teil der Versuche war die Quecksilberdampflampe durch die Glühbirne ersetzt. Die Extrakte (je 3 cm$^3$) befanden sich während der Exposition je nach angewandter Strahlungsart entweder in Quarzröhrchen mit einem Durchmesser von 20 mm (ultraviolettes Licht) oder in Thunberg-Röhrchen mit einem Durchmesser von 16 mm (sichtbares Licht). Die benutzten Photosensibilisatoren waren die gleichen wie bei den Versuchen an Ohrmuscheln der Kaninchen (s. u.). — Deren Bestrahlung wurde nach sorgfältiger Abdeckung der als Kontrolle dienenden Abschnitte unter intensiver Ventilatorkühlung durchgeführt. Photosensibilisatoren wurden schon 30 min vor der Belichtung durch die Ohrmuscheln mit den Lösungen geströmt und dies während der ganzen Dauer der Bestrahlung fortgesetzt, um eine möglichst hohe Konzentration dieser Stoffe in der Zelle zu erreichen. Als Sensibilisatoren dienten Eosin, Neutralrot (beide 1:500000), Riboflavin (1:100000), Hämatoporphyrin-Nencki[1], Fluorescein-Na (beide 1:25000) und Chininsulfat (1:1000). — Nach Beendigung der Bestrahlung wurde in allen Vergleichsobjekten (Extrakten oder Ohrmuschelpaaren) zu gleicher Zeit die Fermentaktivität mit Hilfe von TTC bestimmt. Dabei wurde die Einwirkung von Licht möglichst weitgehend ausgeschlossen, da sich der Reduktionsindicator unter Lichteinfluß in Formazan umwandeln kann (Hausser, Jerchel u. R. Kuhn).

[1] Das Präparat wurde uns von den Nordmark-Werken zur Verfügung gestellt.

## Versuchsergebnisse.

### *1. Charakterisierung des wasserstoffübertragenden Fermentsystems.*

Der Fermentcharakter der in den Extrakten aus der Cutis des Meerschweinchens zu beobachtenden TTC-Reduktion wurde durch die Feststellung gesichert, daß nach ihrer Erhitzung auf 70° C die Formazanbildung ausbleibt. Für die Natur des beteiligten Enzyms ließen sich folgende Anhaltspunkte gewinnen. Zunächst wurde an die Succinodehydrogenase gedacht, da sie zur TTC-Reduktion fähig (Kun u. Abood) und in der Haut nachgewiesen ist (Carruthers u. Suntzeff). Doch spielt sie offenbar unter den gewählten Versuchsbedingungen für die beobachtete TTC-Reduktion keine wesentliche Rolle, denn der spezifische Hemmstoff Malonat hemmte die Formazanentwicklung nachweisbar erst in der Konzentration von m/10 (20% Hemmung). Die Haut ist nun durch glykolytische Aktivität ausgezeichnet (Wohlgemuth u. Klopstock) und es wurde daher vermutet, daß das gesuchte Ferment zu den wasserstoffübertragenden Enzymen der Glykolyse gehört. Diese Vermutung gewann durch den Nachweis an Wahrscheinlichkeit, daß gerade m/100 Cyanid die TTC-Reduktion unterdrückten (vgl. Versuchsbeispiel 1 in Tab. 1). In dieser Konzentration hemmt nämlich Cyanid auch die Glykolyse (Warburg). In Betracht war nun vor allem die Triosephosphatdehydrogenase zu ziehen, da sie nach E. Kun unter Zwischenschaltung eines gelben Ferments zur TTC-Reduktion fähig ist. Das zugehörige Coferment ist bekanntlich DPN. Das trifft auch für das untersuchte Ferment zu; denn ältere, unter Sauerstoffabschluß inaktiv gewordene Fermentextrakte ließen sich durch Zugabe von DPN[1] reaktivieren (vgl. Versuchsbeispiel 2). Die Triosephosphatdehydrogenase ist ein SH-Ferment (Rapkine). Das Enzym ist dadurch ausgezeichnet, daß seine SH-Gruppen besonders oxydationslabil sind, so daß beispielsweise das kristallisierte Ferment nur in Gegenwart von Reduktionsmitteln seine volle Aktivität gewinnt (Cori u. Mitarb.). Die Sauerstoffempfindlichkeit besitzt auch das TTC-reduzierende Ferment. Frische, vor allem aber bei Luftzutritt gelagerte Fermentlösungen ließen sich in der Regel durch Cysteinzusatz mehr oder weniger bedeutend in ihrer Aktivität steigern (vgl. Versuchsbeispiel 7 u. 8 in Tab. 2). Der Nachweis, daß es sich auch bei dem untersuchten Enzym um ein SH-Ferment handelt, wurde durch die Feststellung erbracht, daß die SH-Reagentien p-Chloromercuribenzoat und o-Jodosobenzoat (Literatur bei Barron) in geeigneter Konzentration das Enzym vollständig inaktivierten und daß sich in charakteristischer Weise die Hemmungen durch nachträglichen Zusatz von Cystein zum größeren Teil rückgängig machen ließen (vgl. Versuchsbeispiel 3 u. 4 in Tab. 1).

Die beschriebenen Versuchsresultate weisen nach, daß die TTC-Reduktion in den benutzten Cutisextrakten ein fermentativer Prozeß ist und zeigen, daß dabei ein SH-Ferment, vermutlich die Triosephosphatdehydrogenase, eine entscheidende Rolle spielt.

Diese Ergebnisse lassen sich nicht ohne weiteres auf die intakte Haut übertragen, für die als Versuchsobjekt die isolierte Ohrmuschel des Kaninchens diente. Doch konnte der Nachweis geführt werden, daß auch hier die TTC-Reduktion ein rein fermentativer Prozeß ist und daß daran nicht die zellständigen Sulfhydrylkörper beteiligt sind, wie das im Gegensatz zu einer großen Zahl anderer Untersucher von Antopol u. Mitarb. und von Zingsheim angenommen wurde.

---

[1] DPN verdanken wir Herrn Prof. O. Warburg (Berlin-Dahlem).

*Tabelle 1.*

| Versuchs-beispiel | Ansatz mit je 3 cm³ Fermentlösung (Cutisextrakt) | Formazan in 60 min $\gamma$ | Ferment-aktivität % |
|---|---|---|---|
| 1 | unbehandelt | 150 | 100 |
| | mit m/100 Cyanid (neutralisiert) | 16 | 11 |
| 2 | frische Fermentlösung | 153 | 100 |
| | desgl., mit 0,5 mg DPN | 158 | 103 |
| | 48 Std alte Fermentlösung | 70 | 46 |
| | desgl., mit 0,5 mg DPN | 148 | 97 |
| 3 | unbehandelt | 143 | 100 |
| | mit $6 \times 10^{-4}$ m p-Chloromercuribenzoat (20 min Vorinkubation) | 0 | 0 |
| | desgl., anschließend Zusatz von Cystein ($3 \times 10^{-3}$ m) | 132 | 92 |
| 4 | unbehandelt | 154 | 100 |
| | mit $3 \times 10^{-4}$ m o-Jodosobenzoat (1 min Vorinkubation | 0 | 0 |
| | desgl., anschließend Zusatz von Cystein ($3 \times 10^{-3}$m) | 94 | 61 |

Dazu wurden an der Ohrmuschel Versuche mit einigen Reagentien angestellt, die auf Grund ihres unterschiedlichen Angriffspunktes die beiden Prozesse differenzieren lassen. Nach halbstündiger Vordurchströmung von Ohrmuscheln mit den Fermenthemmstoffen Cyanid (0,1%ig) oder Urethan (2%ig) blieb bei anschließendem Durchlauf der TTC-Lösung die gewohnte Formazanverfärbung aus. Unter gleichen Bedingungen wurde die Zahl der fixen Sulfhydrylgruppen — beurteilt nach der Telluritreaktion — unverändert gefunden. Schon diese Beobachtungen sichern auch für die intakte Haut den fermentativen Charakter der TTC-Reduktion. Aber auch von der anderen Seite her konnte diese Sicherung durchgeführt werden. Es ließ sich nämlich nachweisen, daß durch Ausschaltung der fixen SH-Gruppen der Haut das Ausmaß der Formazanbildung nicht beeinflußt wird, und damit zeigen, daß diese Sulfhydrylkörper nicht an der TTC-Reduktion in der intakten Haut beteiligt sind. Für diesen Nachweis wurden die SH-Gifte Monojodacetat (0,5%ig) und Alloxan (2%ig) benutzt. Nach halbstündiger Vordurchströmung der Ohrmuscheln mit den Lösungen dieser Reagentien waren — beurteilt nach der Telluritreaktion — keine frei reagierenden, fixen SH-Gruppen mehr vorhanden; trotzdem kam im Parallelversuch die fermentative Formazanbildung ungehindert zustande. — Letztere Beobachtung mag zunächst unverständlich erscheinen, da man ja annehmen könnte, daß die Sulfhydrylgifte auch das an der TTC-Reduktion beteiligte SH-Ferment blockiert haben sollten. Nun wird zwar das Ferment in vitro tatsächlich bei den angegebenen Konzentrationen durch Alloxan (90%) und Jodacetat (30%) gehemmt, doch lassen diese Feststellungen noch nicht auf die Verhältnisse an der Ohrmuschel schließen. Denn anders als in vitro ist die Reaktion zwischen SH-Gift und Ferment-SH an der Ohrmuschel in mehrfacher Hinsicht erschwert. Die von der Arterie aus zugeführten SH-Reagentien müssen erst die Permeabilitätsschranken von Gefäß- und Zellwand passieren, ehe sie die im Zellinnern lokalisierten Fermente erreichen können. Unter der wahrscheinlich zutreffenden Voraussetzung, daß die genannten Fermenthemmstoffe nur beschränkt permeierfähig sind, wird ihre Konzentration in der Zelle bei unseren kurzfristigen Versuchen wesentlich geringer sein als in der Durchströmungsflüssigkeit. Außerdem wird das Ferment-SH vor dem

Angriff der SH-Reagentien durch Substrat und Coferment geschützt (Literatur bei Barron), die nur in der Zelle in optimaler Konzentration vorhanden sein dürften. Zum wenigsten kann man vermuten, daß das Fehlen einer Fermenthemmung durch Alloxan und Jodacetat auf diesen Verhältnissen beruht.

### *2. Belichtung fermenthaltiger Extrakte der Cutis.*

Die Untersuchung des Lichteinflusses wurde sowohl mit wie auch ohne Photosensibilisatoren in den Fermentlösungen durchgeführt. — Bei den Versuchen *mit* Sensibilisatoren war zu berücksichtigen, daß diese in manchen Fällen auch ohne Belichtung Wirkungen zustandebringen können, die denen unter Lichteinfluß gleichen. Es wurde jedoch gefunden, daß eine „Dunkelwirkung" der benutzten Sensibilisatoren auf die Fermentaktivität in der Regel fehlt und nur beim Fluorescein gering ausgeprägt vorhanden ist. Als Strahlungsquellen dienten Quecksilberdampflampe (bei Chininsulfat und Riboflavin) oder Glühbirne (bei Riboflavin, Hämatoporphyrin, Eosin und Neutralrot).

In den Ansätzen mit Photosensibilisatoren führte in jedem Fall der Lichteinfluß bei Gegenwart von Sauerstoff (Luftzutritt) mehr oder weniger schnell zur Inaktivierung des Ferments. Die Aktivität ließ sich durch Zusatz eines Reduktionsmittels (Cystein) teilweise wiederherstellen (vgl. Versuchsbeispiel 5 in Tab. 2). Bei Abwesenheit von Sauerstoff blieb die Lichthemmung des Ferments nicht nur aus, sondern es wurde regelmäßig eine Aktivitätssteigerung beobachtet, die bei wenig aktiven Präparaten besonders groß war (vgl. Versuchsbeispiel 6). Dieser Aktivierungseffekt des Lichts wurde, allerdings weniger ausgeprägt, auch in Fermentansätzen beobachtet, denen ein Sensibilisator nicht zugesetzt war.

Die Belichtungsversuche *ohne* Photosensibilisatoren wurden vor allem mit dem ausgefilterten langwelligen UV oder dem vollen Licht der Quecksilberdampflampe durchgeführt. Bei Benutzung von Fermentlösungen, die mit dem Luftsauerstoff im Gleichgewicht standen, wurde in jedem Fall Inaktivierung des Ferments gefunden. Bei Anwendung des vollen Lichts der Quecksilberdampflampe kam der Aktivitätsverlust des Enzyms wesentlich schneller als durch langwelliges UV zustande. Durch nachträglichen Zusatz von Cystein ließ sich die Hemmung in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit mehr oder weniger weitgehend rückgängig machen. Fermentlösungen, denen Cystein unmittelbar vor der Exposition zugesetzt war, konnten teilweise vor der Strahleninaktivierung geschützt werden (vgl. Versuchsbeispiele 7 u. 8). Bei Abwesenheit von Sauerstoff wurde das Ausmaß der Lichthemmung wesentlich kleiner gefunden (langdauernde Exposition) oder die Hemmung fehlte ganz (kurzfristige Bestrahlung). Gelegentlich wurde bei kurzer Exposition sogar eine geringe Aktivitätssteigerung beobachtet (vgl. Versuchsbeispiel 9).

### *3. Belichtung der isolierten Ohrmuschel des Kaninchens.*

Der Einfluß des Lichts auf die Aktivität des Ferments wurde auch in der intakten Haut sowohl mit wie ohne Anwesenheit von Photosensibilisatoren untersucht.

*Tabelle 2.*

| Versuchsbeispiel | Ansatz mit je 3 cm³ Fermentlösung (Cutisextrakt) | Formazan in 60 min γ | Fermentaktivität % |
|---|---|---|---|
| 5 | unbehandelt | 145 | 100 |
| | mit $2 \times 10^{-3}$ m Cystein | 145 | 100 |
| | 5 min bei Luftzutritt bestrahlt (Quecksilberdampflampe) | 143 | 99 |
| | mit Chininsulfat 1:4000, unbestrahlt | 145 | 100 |
| | desgl., jedoch 5 min bei Luftzutritt bestrahlt (Quecksilberdampflampe) | 3 | 2 |
| | desgl., nach Bestrahlung Zusatz von Cystein ($2 \times 10^{-3}$ m) | 105 | 72 |
| 6 | unbehandelt | 78 | 100 |
| | 60 min bei Luftzutritt bestrahlt (Glühbirne) | 78 | 100 |
| | 60 min im Vakuum bestrahlt (Glühbirne) | 123 | 158 |
| | mit Hämatoporphyrin 1:100000 60 min bei Luftzutritt bestrahlt (Glühbirne) | 48 | 62 |
| | desgl., im Vakuum bestrahlt | 153 | 196 |
| 7 | unbehandelt | 156 | 87 |
| | mit $2 \times 10^{-3}$ m Cystein | 180 | 100 |
| | 60 min langweiliges UV bei Luftzutritt | 122 | 61 |
| | desgl., anschließend Zusatz von Cystein ($2 \times 10^{-3}$ m) | 176 | 98 |
| 8 | unbehandelt | 143 | 88 |
| | mit $4 \times 10^{-3}$ m Cystein | 163 | 100 |
| | 20 min bei Luftzutritt bestrahlt (Quecksilberdampflampe) | 13 | 8 |
| | desgl., anschließend Zusatz von Cystein ($4 \times 10^{-3}$ m) | 88 | 54 |
| | desgl., bei Anwesenheit von Cystein ($4 \times 10^{-3}$ m) | 73 | 45 |
| 9 | unbehandelt | 153 | 100 |
| | 15 min bei Luftzutritt bestrahlt (Quecksilberdampflampe) | 116 | 76 |
| | 15 min in reinem Stickstoff bestrahlt (Quecksilberdampflampe) | 184 | 120 |

Es wurden die gleichen Strahlungsquellen wie bei den in vitro-Versuchen an Fermentlösungen benutzt. — Bei den Versuchen *mit* Photosensibilisatoren kam es darauf an, eine gewisse Anreicherung dieser Stoffe in der Zelle zu erreichen. Neben einer möglichst lange durchgeführten Durchströmung der Ohren mit den Lösungen der Sensibilisatoren wurde zu dem gleichen Zweck auch das $p_H$ ihrer Lösungen verschiedentlich (zwischen $p_H$ 6 und 8) variiert, da die Permeierfähigkeit der Stoffe mit von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt (vgl. hierzu Jodlbauer u. Haffner). Die Belichtungszeit mußte bei Anwendung der Quecksilberdampflampe auf 15 min Dauer begrenzt bleiben, da bei weitergehender Exposition schon am nichtsensibilisierten Kontrollohr ein Hemmeffekt zustande kam. Bei Verwendung der Glühbirne konnte die Belichtungsdauer bis auf 120 min aus-

gedehnt werden, ohne daß sich Anzeichen für einen solchen Effekt am Kontrollohr fanden.

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen fehlten auch an der senibilisierten Ohrmuschel Lichtwirkungen auf die Fermentaktivität meist ganz. Nur bei Durchströmung der Ohrmuscheln mit Fluorescein- oder Hämatoporphyrin-Lösungen ($p_H$ 6) wurde — in den meisten Fällen — eine auf den bestrahlten Bezirk beschränkte, geringe Fermenthemmung gefunden.

Abb. 1. Lichtinaktivierung eines wasserstoffübertragenden Ferments in der Haut isolierter Kaninchenohren. Im bestrahlten streifenförmigen Bezirk ist bei Durchströmung der Ohrmuscheln mit einer TTC-Lösung die Rotverfärbung durch fermentative Formazanbildung schwächer als im unbestrahlten Teil. Links: volles Licht der Quecksilberdampflampe. Rechts: ausgefiltertes langwelliges UV. Beiderseits: 80 min Exposition.

Im Gegensatz dazu war, wie oben gezeigt, in vitro mit *allen* untersuchten Sensibilisatoren eine ausgeprägte Lichtinaktivierung zu erhalten gewesen. Die abweichenden Befunde an der intakten Haut erklären sich vermutlich dadurch, daß bei den notwendigerweise kurzdauernden Versuchen an der überlebenden Ohrmuschel eine ausreichende Konzentration der Photosensibilisatoren in der Zelle meist nicht erreicht wurde.

Die Belichtungsversuche *ohne* Photosensibilisatoren brachten eindeutige Ergebnisse. Nach Bestrahlung von Ohrmuschelausschnitten mit langwelligem UV zeigte sich die Fermentaktivität im bestrahlten Bezirk bei einer Belichtungszeit bis zu 60 min nicht beeinflußt, während bei noch längerer Exposition zunehmend eine deutliche, wenn auch relativ schwache Hemmung gefunden wurde (vgl. Abb. 2 rechts). Bei Anwendung des vollen Lichts der Quecksilberdampflampe war der Hemmeffekt viel erheblicher (vgl. Abb. 2 links) und schon innerhalb 30 min Exposition ausgeprägt vorhanden. Eine Aktivitätssteigerung wurde niemals beobachtet.

## Diskussion.

Die *in vitro* mit dem untersuchten SH-Ferment erhaltenen Versuchsergebnisse geben einen neuen Gesichtspunkt für das Verständnis der Lichtinaktivierung von Fermenten bei Gegenwart von Sauerstoff.

Als Ursache für die Lichthemmung bei Anwesenheit von Photosensibilisatoren war bisher vor allem die Oxydation von Tryptophan, Tyrosin und Histidin im Fermentprotein und die Denaturierung des Apoferments in Betracht zu ziehen (Literatur bei Errera). Die nichtsensibilisierte Inaktivierung durch ultraviolettes Licht war bislang vorwiegend auf Zerstörung der Ringstruktur cyclischer Aminosäuren, Sprengung von Peptid-, Disulfid- und Wasserstoffbrücken, intramolekulare Umlagerungen und Denaturierung des Fermentproteins zurückzuführen (Übersicht von Errera u. Herve). Auch an eine Zerstörung der wasserstoffübertragenden Cofermente (Warburg u. Christian, Seraydarian u. Mitarb.) war zu denken.

Die vorliegenden Versuchsresultate legen die Annahme nahe, daß der Lichtinaktivierung von SH-Fermenten, die zu ihrer Aktivität freie SH-Gruppen benötigen, auch ein anderer Mechanismus zugrunde liegen kann. Die Inaktivierung des untersuchten SH-Ferments ist unter den gewählten Bedingungen offenbar mit Photooxydationen verknüpft, denn bei Abwesenheit von Sauerstoff blieb dieser Lichteffekt aus. Als Angriffspunkt der Photooxydationen kam vor allem das Ferment-SH in Betracht, das sich als oxydationslabil erwiesen hatte. Nach Oxydation des Fermentsulfhydryls durch das SH-Reagens o-Jodosobenzoat wurde das Enzym inaktiv gefunden; seine Aktivität ließ sich durch ein Reduktionsmittel wiederherstellen. Im Hinblick auf diese Feststellungen liegt nun für die Lichtversuche die Schlußfolgerung nahe, daß die Photooxydationen gleichfalls vorwiegend das Fermentsulfhydryl betreffen und daß dies eine wesentliche Ursache der beobachteten Lichthemmung ist. Dieser Schluß wird durch die Feststellung beweiskräftig, daß die Fermentaktivität durch ein Reduktionsmittel weitgehend wiederhergestellt werden konnte. Soweit die Lichthemmung in dieser Weise rückgängig zu machen war, konnten ihr ja nicht die oben aus der Literatur genannten, als irreversibel anzusehenden Lichtwirkungen zugrunde liegen. Die hervortretende Bedeutung der SH-Gruppe für die Inaktivierung entsprechender Fermente durch *Licht* ergänzt die von Barron u. Mitarb. getroffene, gleichsinnige Feststellung bei Verwendung *ionisierender* Strahlen. — Über die Natur der bei Abwesenheit von Sauerstoff beobachteten Lichtaktivierung des untersuchten Ferments lassen sich noch keine experimentell fundierten Angaben machen.

In der *intakten Haut* wurde, soweit ein Lichteffekt nachweisbar war, nur Inaktivierung des Ferments gefunden. Die Bedeutung dieses Befundes für die Genese von Lichtschäden an der Haut läßt sich wegen der Kompliziertheit des Problems schwer beurteilen. Immerhin kann in Be-

tracht gezogen werden, daß neben anderen Faktoren die Lichtinaktivierung des untersuchten Enzyms (und gegebenenfalls auch weiterer SH-Fermente) am Zustandekommen der Photosensibilisationsdermatosen und des Lichterythems beteiligt ist. Für diesen Zusammenhang sei angeführt, daß die klinischen Erscheinungen der genannten Lichtdermatosen in wesentlichen Merkmalen (Entzündung, Blasen- und Geschwürsbildung) vergleichbar sind den Hautsymptomen nach lokaler Applikation der thiolpriven, SH-Fermente hemmenden Substanzen (Übersicht bei Peters).

## Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst gezeigt, daß sich mit Hilfe des Reduktionsindicators Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Extrakten der Cutis (vom Meerschweinchen) und in der intakten Haut (der isolierten Ohrmuschel des Kaninchens) die Aktivität eines wasserstoffübertragenden Fermentsystems bestimmen läßt. Weiter wird nachgewiesen, daß an der beobachteten TTC-Reduktion entscheidend ein sogenanntes SH-Ferment beteiligt ist, dessen Aktivität von freien Sulfhydrylgruppen abhängt. Von diesen Feststellungen ausgehend wird der Einfluß der Strahlung einer Glühbirne, des ausgefilterten langwelligen UV und des vollen Lichts einer Quecksilberdampflampe auf die Aktivität des Ferments sowohl mit wie ohne Photosensibilisatoren geprüft. — Die Bestrahlung der Cutisextrakte bei Gegenwart von Sauerstoff führte in jedem Fall zur Fermenthemmung. Als wesentliche Ursache dafür wurde die Photooxydation des Ferment-SH erkannt. Bei Abwesenheit von Sauerstoff blieb die Hemmung nicht nur aus, sondern wandte sich in eine Lichtaktivierung des untersuchten Enzyms um, die ursächlich ungeklärt blieb. — Nach Belichtung der intakten Haut wurde, soweit ein Effekt auftrat, immer nur Inaktivierung des Ferments gefunden. Auf die Möglichkeit einer Bedeutung dieser Beobachtung für das Verständnis der Photosensibilisationsdermatosen und des Lichterythems wird hingewiesen.

## Literatur.

Antopol, W., S. Glaubach and L. Goodman: Publ. Health Rep. **1948**, 1231; zit. nach Exc. med. (II) **2**, 697 (1949). — Barron, E. S. G.: Thiol groups of biological importance. Adv. Enzymol. **11**, 201 (1951). — Barron, E. S. G., S. Dickman, J. A. Muntz and T. P. Singer: J. Gen. Physiol. **32**, 537 (1949). — Barron, E. S. G., and S. Dickman: J. Gen. Physiol. **32**, 595 (1949). — Carruthers, Chr., and V. Suntzeff: Cancer Res. **7**, 9 (1947). — Cori, G. T., M. W. Slein and C. F. Cori: J. of Biol. Chem. **173**, 605 (1948). — Doerr, W.: Frankf. Z. Path. **61**, 557 (1950). — Errera, M.: Progr. Biophysics a. Biophysical Chem. **3**, 88 (1953). — Errera, M., et A. Herve: Mécanismes de l'action biologique des radiations. Liège: Editions Desoer, Paris: Masson et Cie. — Flesh, P., and St. Rothman: Science (Lancaster, Pa.) **108**, 505 (1948). — Hausser, I., D. Jerchel u. R. Kuhn: Chem. Ber. **82**, 195

(1949). — Jodlbauer, A., u. F. Haffner: Pflügers Arch. **189**, 243 (1921). — Kuhn, R., u. F. Linke: Liebigs Ann. **578**, 155 (1952). — Kun, E.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **78**, 195 (1951). — Kun, E., and L. G. Abood: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 144 (1949). — Muralt, A. v.: Einführung indie praktische Physiologie. Berlin u. Heidelberg: Springer 1948. — Ortmann, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 12 (1939). — Peters, R. A.: Rev. méd. de Liège **3**, 687 (1948). — Rapkine, L.: Biochemic. J. **32**, 1729 (1938). — Seraydarian, M. W., A. I. Cohen and H. Z. Sable: Amer. J. Physiol. **177**, 150 (1954). — Warburg, O.: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin: Saenger 1946. — Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **282**, 221 (1935). — Wels, P.: Pflügers Arch. **223**, 395 (1930). — Wohlgemuth, J., u. T. Ikebata: Biochem. Z. **186**, 43 (1927). — Wohlgemuth, J., u. E. Klopstock: Biochem. Z. **175**, 202 (1926). — Wohlgemuth, J., u. N. Sugihara: Biochem. Z. **163**, 260 (1925). — Zingsheim, M.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 1630.

Dozent Dr. K. Repke, z. Zt. Institut für Medizin und Biologie, Abt. Biochemie, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 236—242 (1955).

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Szeged/Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. I. Gy. Fazekas).

# Nachweis von Glucocorticoiden in der Muskulatur.

Von

I. Gy. Fazekas.

*(Eingegangen am 27. April 1955.)*

Die sogenannten Glucocorticoide der Nebennierenrinde steigern den Leber- und Muskelglykogen-, sowie Blutzuckergehalt von normalen und adrenalektomierten Tieren.

Nach allgemeiner Auffassung sollen die Nebennierenrindenhormone im Organismus „rasch inaktiviert werden". In früheren Untersuchungen wurde aber nachgewiesen, daß adrenalektomierte Mäuse durch Verabreichung von Leberextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren am Leben gehalten werden können[7], ferner der Leberextrakt von normalen Kaninchen[8] sowie von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren[9] den Glykogengehalt in Leber und Muskulatur von normalen oder adrenalektomierten Ratten und Mäusen vermehrt, und zwar der letztgenannte Extrakt in höherem Grade. Diese Angaben lassen vermuten, daß die Leber in gewissem Maße Glucocorticoide und andere Rindensteroide speichert und daß ferner der Glykogen- und Glucocorticoidgehalt in der Leber miteinander in geradem Verhältnis stehen. Dafür spricht auch unser früherer Befund, daß der Glykogengehalt in Leber und Muskulatur von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren viel größer ist als der von normalen Kaninchen[5b], ferner der Rindenextrakt aus hypertrophischen Nebennieren den Glykogengehalt in Leber und Muskulatur von adrenalektomierten Mäusen in größerem Maße steigert als der normale Nebennierenextrakt[5a].

Da neben der Leber auch die Muskulatur einen verhältnismäßig größeren Glykogenvorrat besitzt, war es wünschenswert, nachzuprüfen, ob auch aus der Muskulatur ein Extrakt hergestellt werden kann, der auf den Kohlenhydratstoffwechsel einen ähnlichen Einfluß ausübt wie der Leberextrakt bzw. die Glucocorticoide.

Um die Frage zu klären, haben wir aus der insgesamt 11,5 kg schweren Muskulatur von 10 Kaninchen nach Zerkleinerung mit einer Fleischmühle ein Extrakt mit der Methode von Swingle-Pfiffner (1931) gewonnen. 1 $cm^3$ dieses Extraktes entsprach 100 g Muskel.

Zwecks Konservierung wurde zum Extrakt 0,01% Benzolsäure gegeben, das Extrakt in Ampullen gefüllt und im Kühlschrank bei konstanter Temperatur von + 2° C aufbewahrt. Der Extraktstoff ist in 85—70%igem Alkohol, in Benzol und Aceton gut löslich, in Petroläther unlöslich, enthält kein Eiweiß, Fett, Cholesterin, keine Fettsäure. Die anhand der Callowschen Methode mit 1 $cm^3$ Muskelextrakt durchgeführte Zimmermannsche 17-Ketosteroidreaktion fiel negativ aus. Wurde aber die Reaktion mit 0,2 $cm^3$ Extrakt ohne Ausschüttelung mit Äther unmittelbar durchgeführt, so wurde eine Farbreaktion erzielt, die sonst mit 0,5 mg 17-Ketosteroiden erzielt werden kann (auf 1 kg Muskel berechnet ein Wert von 25 mg).

1. Zuerst wurde der Einfluß unseres Muskelextraktes auf die Glykogenbildung mit der Methode von Venning, Kazmin u. Bell zur biologischen Auswertung der Glykogenhormone untersucht.

Mit eiweißreicher Diät ernährte, 20—25 g schwere, männliche, weiße Mäuse gleicher Abkunft wurden am 4. Tag nach Adrenalektomie mit subkutanen Muskelextraktinjektionen behandelt, dann getötet und der Glykogengehalt ihrer Leber bestimmt. Dieser Gehalt wurde dann mit dem von nichtbehandelten, gleichernährten, adrenalektomierten männlichen Mäusen verglichen (Methode vgl. [8]). Auch in der Muskulatur wurde der Glykogengehalt bestimmt. Die Versuchstiere wurden in Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt: Die 1. Gruppe diente ohne Behandlung als Kontrolle, die Tiere der 2. Gruppe wurden mit der A, die der 3. mit der B-Lösung behandelt. Beide Lösungen enthielten in 14 cm³ 1,45 cm³ Alkohol (96%), 0,70 g Glukose und Aquadest, jedoch die A-Lösung 3 cm³, die B-Lösung 6 cm³ Muskelextrakt.

Den Tieren der 2. und 3. Gruppe wurden während 5 Std 7mal subkutan je 0,2, insgesamt 1,4 cm³ der entsprechenden Lösung verabfolgt (2. Gruppe insgesamt 0,3, 3. Gruppe 0,6 cm³ Muskelextrakt). Eine Std nach der 7. Injektion wurden die Tiere geköpft, die Leber sofort entfernt, die Muskulatur abgetrennt und der Glykogengehalt nach Good, Kramer and Somogyi bestimmt und in mg% angegeben. Auf gleiche Weise wurde an den Kontrollmäusen verfahren. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 1 verzeichnet.

Tabelle 1. *Leber- und Muskelglykogengehalt von männlichen adrenalektomierten nicht behandelten sowie mit Muskelextrakt von normalen Kaninchen behandelten weißen Mäusen.*

| Tier Nr. | 1. Gruppe | | 2. Gruppe | | 3. Gruppe | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | nicht behandelte Kontrolltiere | | nach Verabfolgung von 0,3 cm³ Kaninchenmuskelextrakt | | nach Verabfolgung von 0,6 cm³ Kaninchenmuskelextrakt | |
| | Leber- | Muskel- | Leber- | Muskel- | Leber- | Muskel- |
| | Glykogengehalt in mg% | | | | | |
| 1. | 46 | 38 | 858 | 198 | 1494 | 1308 |
| 2. | 100 | 49 | 329 | 220 | 1211 | 606 |
| 3. | 43 | 27 | 350 | 217 | 1718 | 919 |
| 4. | 62 | 28 | 483 | 343 | 1643 | 1361 |
| 5. | 54 | 40 | 386 | 212 | 1236 | 917 |
| 6. | 75 | 52 | 286 | 178 | 1316 | 810 |
| 7. | 66 | 42 | 303 | 225 | 1025 | 672 |
| 8. | 58 | 36 | 722 | 321 | 1215 | 600 |
| Mittelwert: | 63 | 39 | 464 | 239 | 1357 | 899 |

Die Zahlen der Tab. 1 zeigen, daß der Muskelextrakt normaler Kaninchen den Leber- und Muskelglykogengehalt von adrenalektomierten Mäusen — im Verhältnis zur verabreichten Menge — in hohem Maße steigert. Der von uns hergestellte Muskelextrakt enthält also *einen Wirkstoff*, der die Glykogenspeicherung in Leber und Muskulatur befördert, d. h. *dieselbe Wirkung ausübt wie die Glucocorticoide der Nebennierenrinde.*

2. Danach wurde der Einfluß des Muskelextraktes auf den Nüchtern-Blutzuckergehalt von 10 normalen männlichen Ratten untersucht.

Zu diesem Zwecke wurde je einem Tier 0,025—0,05—0,1—0,2 cm³ Muskelextrakt pro 10 g Körpergewicht subkutan verabfolgt. Der Nüchtern-Blutzucker wurde vor der Behandlung sowie 10, 20, 30 min, ferner 1, 2, 4 Std nach der Injektion mit der Methode von Hagedorn-Jensen (modifiziert von Fujita) bestimmt. 2 bis 4 Std nach der Behandlung wurden die Tiere geköpft und der Glykogengehalt in Leber sowie Muskulatur bestimmt. Leber- und Muskelglykogengehalt von 6 männlichen, nicht behandelten, gleichernährten Kontrollratten wurde gleichzeitig untersucht. Die diesbezüglichen Daten sind in Tab. 2 und 3 verzeichnet.

Tabelle 2. *Blutzucker-, Leber- und Muskelglykogengehalt von normalen männlichen nicht behandelten Kontrollratten.*

| Tier Nr. | Körpergewicht | Blutzucker | Leber- | Muskel- |
|---|---|---|---|---|
| | | | glykogen | |
| | g | mg% | mg% | |
| 1. | 152 | 82 | 1343 | 392 |
| 2. | 110 | 80 | 1285 | 361 |
| 3. | 120 | 88 | 1710 | 391 |
| 4. | 130 | 80 | 1760 | 314 |
| 5. | 150 | 88 | 1447 | 313 |
| 6. | 145 | 92 | 1407 | 331 |
| Mittelwert: | 136 | 85 | 1469 | 350 |

Tabelle 3. *Einfluß des Muskelextraktes von normalen Kaninchen auf den Blutzucker-, sowie Leber- und Muskelglykogengehalt von männlichen Ratten.*

| Tier Nr. | Körpergewicht | Muskelextrakt auf 10 g Körpergewicht umgerechnet | Blutzucker | | | | | | | Maximaler Blutzucker-anstieg | | | Glykogen nach | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 10 | 20 | 30 | 1 | 2 | 4 | | | | 2 | 4 | 2 | 4 |
| | | | | min | | | Std | | | | | | Stunden in | | | |
| | | | vor | nach | | | | | | | | | Leber | | Muskulatur | |
| | | | der Verabfolgung von Muskelextrakt | | | | | | | | | | | | | |
| | g | cm³ | mg% | | | | | | | min | mg% | % | mg% | | | |
| 1. | 210 | 0,025 | 115 | 120 | *126* | 125 | 114 | 117 | 116 | 20 | 11 | 9 | — | 1264 | — | 480 |
| 2. | 210 | 0,025 | 105 | 119 | 129 | *138* | 122 | 108 | 109 | 30 | 33 | 31 | — | 2897 | — | 526 |
| 3. | 230 | 0,050 | 108 | 119 | *131* | 127 | 111 | 107 | 112 | 20 | 23 | 21 | — | 2463 | — | 466 |
| 4. | 250 | 0,050 | 110 | 121 | *135* | 129 | 117 | 115 | 114 | 20 | 25 | 23 | — | 2459 | — | 501 |
| 5. | 250 | 0,050 | 115 | 131 | *138* | 129 | 125 | 119 | 120 | 20 | 23 | 20 | — | 2384 | — | 470 |
| 6. | 230 | 0,100 | 120 | 123 | *153* | 149 | 147 | 133 | — | 20 | 33 | 28 | 3191 | — | 401 | — |
| 7. | 250 | 0,100 | 128 | 172 | *193* | 174 | 156 | 134 | — | 20 | 65 | 50 | 2151 | — | 427 | — |
| 8. | 160 | 0,200 | 118 | 151 | *153* | 139 | 132 | 125 | — | 20 | 35 | 28 | 2959 | — | 364 | — |
| 9. | 230 | 0,200 | 84 | 115 | 149 | *165* | 99 | 85 | — | 30 | 81 | 96 | 3142 | — | 506 | — |
| 10. | 220 | 0,200 | 80 | 87 | 95 | *117* | 96 | 87 | — | 30 | 37 | 46 | 2698 | — | 428 | — |
| Mittelwert: | 224 | 0,100 | 108 | 126 | 140 | 139 | 122 | 113 | 114 | 23 | 36 | 35 | 2828 | 2292 | 425 | 488 |

Der Blutzucker der mit Muskelextrakt behandelten Ratten (Tab. 3) stieg allmählich an, erreichte den Höhepunkt 20—30 min nach der Einspritzung und kehrte nach 1—2 Std auf den Ausgangswert zurück. Die mittlere maximale Blutzuckerzunahme betrug nach Verabreichung von 0,025 $cm^3$ pro 10 g Körpergewicht 22, nach 0,05 $cm^3$ 24, nach 0,1 $cm^3$ 49, nach 0,2 $cm^3$ 51 mg%. Im Vergleich zu den Glykogenwerten der Kontrollratten war das Leberglykogen der behandelten Ratten nach der Muskelextraktinjektion um etwa 50—100, das Muskelglykogen nach 2 Std um etwa 20—40% erhöht.

Die Untersuchungen zeigen also, daß die Einspritzung des Muskelextraktes von normalen Kaninchen den Blutzucker sowie das Leber- und Muskelglykogen von normalen männlichen Ratten etwa im Verhältnis zur Dosisgröße steigert und somit auf den Kohlenhydratstoffwechsel einen gleichen Einfluß ausübt wie die sogenannten Glucocorticoide der Nebennierenrinde. Auf Grund der Herstellungsmethode, der chemischen und biologischen Eigenschaften halten wir den wirksamen Stoff unseres Muskelextraktes für identisch mit den Glucocorticoiden der Nebennierenrinde bzw. mit einem von ihnen. Dieses Problem kann aber zweifelsohne nur durch chemische Analyse entschieden werden. Unsere Untersuchungen lassen darauf schließen, daß mitsamt dem Glykogen auch *Glucocorticoide* in gewissem Maße *in der Muskulatur* gebunden oder *gespeichert* werden, wie es auch bei der Leber der Fall ist.

Die Mäuseversuche wurden 1 Monat, die Rattenversuche 3 Monate nach Herstellung des Muskelextraktes durchgeführt. Der Extrakt war also auch noch nach 3 Monaten wirksam.

Nach Long u. Mitarb. erhält das Nebennierenextrakt das Muskelglykogen von adrenalektomierten Tieren aufrecht, übt aber auf den Muskelglykogengehalt von hypophysektomierten Tieren einen geringen Einfluß aus, während es in normalen Mäusen einen Anstieg des Muskelglykogens verursachen kann. Andererseits steigt das Leberglykogen in normalen wie adrenalektomierten oder hypophysektomierten Tieren unter dem Einfluß von Rindenextrakt an. Nach Russel[15] übt der HVL aufs Muskelglykogen einen viel größeren Einfluß aus als die Nebennierenrinde. Das HVL-Extrakt steigert das Muskelglykogen in normalen Tieren bei Glucosefutter, das Nebennierenrindenextrakt erhöht aber mehr das Leberglykogen. Auch das ACTH befördert die Speicherung des Muskelglykogens. In adrenalektomierten Tieren hingegen beeinflußt das HVL-Extrakt das Leberglykogen nicht, erhält aber den Muskelglykogengehalt aufrecht, übt sogar auch auf die adrenalektomierten-hypophysektomierten Tiere einen gleichen Einfluß aus[14]. Nach Bennett u. Perkins hat das gereinigte ACTH auf das Muskelglykogen keine Wirkung. Swingle u. Remington wiesen nach, daß die natürlichen Östrogene und auch das Diäthylstilböstrol das Leberglykogen von normalen

Tieren steigern, in adrenalektomierten oder hypophysektomierten Tieren aber keinen Leberglykogenanstieg verursachen. Das weist darauf hin, daß diese Verbindungen den Anstieg des Leberglykogens nur auf indirekte Weise, auf dem Weg über das Hypophysen-Nebennierenrindensystem bewirken können. Da das von uns hergestellte Muskelextrakt das Leber- und Muskelglykogen nicht nur in normalen, sondern auch in adrenalektomierten Tieren zu vermehren vermag, kann die Rolle eines Östrogen- oder Hypophysenwirkstoffes hier ausgeschlossen werden.

Britton u. Mitarb. stellten fest, daß adrenalektomierte Katzen nur durch 2000mal mehr Nebennierenhormon am Leben gehalten werden können, als die Nebennieren des Tieres enthalten. Nach Ingle u. Higgins bilden die Nebennieren einer Ratte soviel Rindenhormon, wie die 750 g schweren Rindernebennieren enthalten. Nach Vogt erzeugt ein 10 kg schwerer Hund täglich soviel Rindenwirkstoff, wie 17300 g Rindernebenniere entspricht, das ist 10000mal mehr als sich in den Nebennieren des Hundes selbst befindet. Daraus läßt sich berrechnen, daß die Nebennierenrinden etwa alle 10 min ihren Hormongehalt neubilden und abgeben. Nach Britton u. Mitarb. übt auch die Einspritzung größerer Mengen von Rindenhormon nur eine kurzdauernde Nachwirkung aus; auch die mit großer Cortinmenge behandelten adrenalektomierten Tiere gehen nur einige Tage später ein als die nichtbehandelten. Auf Grund dieser Befunde wurde gefolgert, daß das Nebennierenrindenhormon im Organismus „stets und rasch inaktiviert" wird. Unsere früheren und neueren Untersuchungen weisen auf das Gegenteil hin. Früher[6] wurde nachgewiesen, daß die mit Nebennierenrindenextrakt von normalen Schweinen behandelten adrenalektomierten Mäuse nach Abbruch der 7tägigen Behandlung nur 2—5 Tage überlebten, die mit gleichen Mäuseeinheiten von Rindenextrakt aus hypertrophischen Schweinenebennieren behandelten adrenalektomierten Mäuse aber nach Abbruch der 7tägigen Behandlung nicht früher als nach 4—15 Tagen eingingen. Dieser Unterschied im Überleben, sowie die Tatsache, daß aus der Leber und Muskulatur von Kaninchen mit normalen oder hypertrophischen Nebennieren ein Stoff hergestellt werden konnte, der eine ähnliche Wirkung ausübt wie die Glucocorticoide, weisen darauf hin, daß im Organismus die Leber und Muskulatur (wahrscheinlich auch andere Gewebsarten) in gewissem Grade Rindensteroide binden bzw. speichern können. Wenn die Rindenhormone tatsächlich so rasch abgebaut oder ausgeschieden (inaktiviert) werden, wie es einige glauben, so müßten die Tiere nach Adrenalektomie oder Abbruch der Rindenhormonzufuhr schon in einigen Stunden eingehen; das ist aber nicht der Fall, da sie mehrere Tage hindurch am Leben bleiben können. Unseres Erachtens ist dies Überleben nur möglich, weil Leber, Muskulatur (und wahrscheinlich auch andere Gewebe) der Tiere eine gewisse Menge Rindensteroide binden (speichern),

deren allmählicher Aufbrauch (Abbau, Ausscheidung) dann die graduelle Verschlimmerung der Rindenausfallsymptome und schließlich das Eingehen der Tiere verursacht.

Puccinelli beobachtete, daß die Oxydation der Buttersäure in der überlebenden Leber von adrenalektomierten Ratten im Verhältnis zur Norm abnahm. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, daß in einer solchen Leber das Nebennierenrindenhormon den normalen Verlauf der Buttersäureoxydation nicht mehr zu sichern vermag. Unserer Meinung nach läßt sich auch aus dieser Angabe, obwohl nur mittelbar, folgern, daß das Nebennierenrindenhormon in normaler Tierleber vorhanden ist, d. i. in gewissem Maße dort gespeichert wird. Übrigens gibt es ja auch andere Beispiele dafür, daß die an einer gewissen Stelle des Organismus gebildeten Stoffe in anderen Organen gespeichert werden. So wird der in der Schleimhaut des Antrum pylori gebildete antiperniziöse Stoff ($B_{12}$) z. B. in der Leber und Muskulatur gespeichert. Diese beim antiperniziösen Stoff bestehende Speicherungsmöglichkeit kann auch bei den Corticosteroiden, im besonderen bei den Glucocorticoiden prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Unsere Untersuchung bietet nun einen Beleg für die Speicherung der Glucocorticoide in der Muskulatur.

## Zusammenfassung.

1. Ein aus der Muskulatur von Kaninchen hergestellter, von Eiweiß, Fetten, Fettsäuren, Cholesterin freier, in Alkohol, Aceton, Wasser löslicher, in Petroläther aber unlöslicher Muskelextrakt gab nach Ausschüttlung mit Äther die Zimmermannsche 17-Ketosteroid-Reaktion nach Callow nicht, wohl aber unmittelbar ohne Ausschüttlung mit Äther.

2. Nach Verabfolgung von Muskelextrakt in 7 subkutanen Injektionen während $5^1/_4$ Std erhöhte sich der Leber- und Muskelglykogengehalt in männlichen, eiweißreich ernährten, adrenalektomierten weißen Mäusen erheblich.

3. Subkutane Injektionen des Muskelextraktes steigerten bei normalen männlichen Ratten im Verhältnis zur Dosisgröße den Blutzuckergehalt, das Leberglykogen und das Muskelglykogen im Vergleich zu den gleichernährten Kontrollratten.

4. Also enhält die Muskulatur von normalen Kaninchen einen Wirkstoff, der auf den Kohlenhydratstoffwechsel einen ähnlichen Einfluß ausübt wie die Glucocorticoide der Nebennierenrinde. Auf Grund der chemischen und biologischen Eigenschaften wird dieser Stoff für identisch gehalten mit den Glucocorticoiden der Nebennierenrinde. Demnach werden also Glucocorticoide auch in der Muskulatur gespeichert, wie nach früheren Untersuchungen in der Leber.

## Literatur.

[1] Bennett, L. L., and R. Z. Perkins: Endocrinology (Springfield, Ill.) **36**, 24 (1945). — [2] Bomskov, Ch., u. K. Bahnsen: Methodik der Hormonforschung, Bd. 1. Leipzig: Thieme 1937. — [3] Britton, S. W., u. Mitarb.: Amer. J. Physiol. **97**, 507 (1931); **99**, 33, 44 (1932). — [4] Callow, N. H.: J. of Endocrin. **1**, 76 (1939). —

[5] Fazekas, I. Gy.: a) Verhandl. Gesellsch. Ung. Path. **11**, 110, 185 (1942); b) Verhandl. Gesellsch. Ung. Path. **12**, 176, 275 (1943). — [6] Fazekas, I. Gy.: Mästung durch Steigerung der Nebennierenrindenfunktion. Acta Med. Szeged/Ungarn **12**, Fasc. 2, 1—213 (1949). — [7] Fazekas, I. Gy.: Endokrinologie **31**, 365 (1954). — [8] Fazekas, I. Gy.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 279 (1955). — [9] Fazekas, I. Gy.: Endokrinologie, im Druck. — [10] Good, C. A., H. Kramer and M. Somogyi: J. of Biol. Chem. **100**, 485 (1933). — [11] Ingle, D. I., and G. W. Higgins: Amer. J. Med. Sci. **196**, 232 (1938). — [12] Long, C. N. H., B. Katzin and E. Fry: Endocrinology (Springfield, Ill.) **26**, 309 (1940). — [13] Puccinelli, E.: Ref. F. Verzár: Lehrb. d. inn. Sekretion S. 257. Liestal: Verl. Ars Medici Lüdin AG. 1948. — [14] Russel, J. A., and L. L. Bennett: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **34**, 406 (1936). — Russel, J. A.: Amer. J. Physiol. **128**, 552 (1940). — [16] Swingle, W. W., and J. J. Pfiffner: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **28**, 510 (1931). — Amer. J. Physiol. **98**, 144 (1931). — Medicine (Baltimore) **11**, 371 (1932). — [17] Swingle, W. W., and J. W. Remington: Physiologic. Rev. **24**, 89 (1944). — [18] Venning, E. H., W. E. Kazmin and J. G. Bell: Endocrinology (Springfield, Ill.) **38**, 79 (1946). — [19] Vogt, M.: J. of Physiol. **102**, 341 (1943). — [20] Zimmermann, W.: Z. physiol. Chem. **233**, 257 (1935); **243**, 45 (1936). — Vitamine u. Hormone **5**, 1, 124, 152, 170, 237, 260, 276 (1944).

Prof. Dr. I. Gy. Fazekas, Institut für gerichtliche Medizin der Universität Szeged/Ungarn.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 243—254 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

# Die sympathicusdämpfende Wirkung des Megaphens.

Von

D. Krause und Dorothee Schmidtke-Ruhnau.

Mit 6 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 2. Mai 1955.)*

Unter den zahlreichen pharmakologischen Wirkungen des Megaphen [N-(3'-Dimethylamino)propyl-3-Chlor-phenothiazin] ist der Antagonismus gegen Erregungszustände des sympathischen Systems sicher von einer erheblichen Bedeutung[6]. Nach der Auffassung von Marquardt[12, 13] ist das Megaphen ein „Adrenolyticum", aber kein „Sympathicolyticum". Marquardt begründet diese Auffassung mit der Tatsache, daß die Wirkung des Notfallshormons Adrenalin durch Megaphen umgekehrt wird, während der pressorische Effekt des Nor-Adrenalins, das heute als der dominierende Überträgerstoff der sympathischen Vasoconstrictoren angesehen wird, nur geringfügig abgeschwächt wird.

Die Berechtigung einer Eingruppierung des Megaphens unter die sogenannten Adrenolytica auf Grund einer vergleichenden Prüfung des Antagonismus gegenüber Adrenalin und Nor-Adrenalin am Blutdruck erschien uns zweifelhaft, weil es bei Versuchen über Antagonismen nach den bisherigen Erfahrungen nicht immer möglich ist, den Effekt einer hämatogenen Zufuhr von Überträgerstoffen gleich dem Effekt der Nervenerregung zu setzen. Heymans[4] und Vleeschhouwer[16], die die Trennung der Begriffe „sympathicolytisch" und „adrenolytisch" in die Literatur eingeführt haben, haben als Kriterium die vergleichende Prüfung des Antagonismus gegenüber dem Effekt einer Nervenerregung durch Enthemmung der pressorischen Kreislaufzentren mit Hilfe der Carotis-Sinus-Entlastung (C.S.E.) und gegenüber der Wirkung einer iv. Adrenalininjektion gewählt. Sie haben dabei festgestellt, daß eine große Zahl therapeutisch angewandter sympathicusdämpfender Pharmaka (Yohimbin, Regitin, Dibenamin, Dioxanderivate, Dihydroergotamin) in geringen Dosierungen nur einen „adrenolytischen", aber keinen „sympathicolytischen" Effekt zeitigen. Ein Überwiegen des „sympathicolytischen" Effektes ist dagegen z. B. beim Ergotamin, sowie den genuinen und hydrierten Alkaloiden der Ergotoxingruppe[14, 8, 9] und einigen Rauwolfia-Alkaloiden[10] festzustellen; alle diese Stoffe haben eine wesentliche zentrale Wirkungskomponente. Da auch dem Megaphen ohne Zweifel

eine wesentliche zentrale Wirkungskomponente zukommt, haben wir uns die Aufgabe gestellt, den gesamten Fragenkomplex der Sympathicusdämpfung durch Megaphen einer genaueren Untersuchung zu unterziehen; besonderer Wert sollte dabei auf die Bestimmung des zentralnervösen Wirkungsanteils gelegt werden.

## Methodik.

Die Versuche wurden an 29 Hunden, 12 Katzen und 5 Präparaten mit isoliertem, über einen gekreuzten Kreislauf ernährtem Hundekopf nach Heymans durchgeführt. — Zur Narkose der Hunde diente Morphin-Chloralose (1 mg/kg im. und 0,08—0,1 g/kg iv.), zur Narkose der Katzen Chloralose-Urethan (0,07 g/kg Chloralose in 25%iger Urethan-Lösung sk.). Die Blutdruckregistrierung erfolgte mit einem Hg-Manometer aus der Art. carotis oder Art. femoralis, als Transmissionsflüssigkeit diente bei den Hunden Natriumzitrat, bei den Katzen Periston mit einem Zusatz von Heparin oder 1 $cm^3$ Xylanester (Boehringer) auf 10 $cm^3$ Transmissionsflüssigkeit. — Um die Kreislaufregulation auf die Carotis-Sinus zu beschränken, wurden in allen Versuchen die Nn. vagi, bei den Katzen auch der Halssympathicus durchtrennt. In den Katzenversuchen wurde auch mit präganglionärer elektrischer Reizung des Halssympathicus und Registrierung der Nickhautkontraktionen gearbeitet; in Ermangelung eines zuverlässigen Impulsgenerators erfolgte die Reizung bei diesen Versuchen mit Wechselstrom (50 Hz) bei einer Spannung von 4 V und einer Reizintensität von 1—5 mA; die Impulsdauer variierte zwischen 2 und 10 sec. Bei den später durchgeführten Versuchen mit elektrischer Reizung des peripheren Vagusstumpfes beim Hund wurde nach der Methodik von Lendle, Mercker u. Rohr[11] unter Einsatz des inzwischen erworbenen Megatests gearbeitet. Injektionen erfolgten mit einer Mikropräzisionsspritze mit sehr feiner Kanüle (Nr. 18 oder Nr. 20) in die freigelegte Vena femoralis.

Bei den meisten Versuchen wurde so vorgegangen, daß zunächst der Effekt einer C.S.E. (für 20—60 sec) festgestellt wurde; die Dosierung der folgenden Injektionen von Nor-Adrenalin und Adrenalin wurde bei den Hundeversuchen meistens so eingestellt, daß der pressorische Effekt beider Stoffe demjenigen der C.S.E. annähernd äquivalent war. In der Regel betrug die Dosis des Nor-Adrenalins (1-Arterenol-hydrochlorid) 1—2 $\gamma$/kg und diejenige des Adrenalins 1,5—4 $\gamma$/kg. Vor der Injektion von Megaphen wurde die Konstanz der Testreaktionen mehrfach überprüft.

Die Herstellung des gekreuzten Kreislaufes erfolgte nach der von Heymans[5] entwickelten Methodik mit einer Modifikation, die sich für die Untersuchung pharmakologischer Effekte auf die sympathischen Anteile der zentralen Kreislaufregulation als vorteilhaft erwiesen hat. Bei der Präparation des isolierten Kopfes kommt es darauf an, daß dieser kreislaufmäßig vom Rumpf völlig abgetrennt wird, während eine Nervenbahn (entweder die Vagi oder das Halsmark) intakt bleiben soll. Bei Untersuchungen über die Reaktion des Vaguszentrums, wenn die Vagi die einzige Verbindung zwischen Kopf und Rumpf darstellen, ist die Unterbrechung des Kreislaufs zwischen Rumpf und Kopf mit Hilfe eines (recht kräftigen!) Écraseurs leicht und rasch zu bewerkstelligen. Wenn dagegen das Halsmark intakt bleiben soll, ist die Anlage des Écraseurs außerordentlich schwierig; wird der Écraseur so fest angelegt, daß die vasalen Kommunikationen zwischen Rumpf und Körper sicher unterbrochen sind, kommt es in der Regel auch zu einer starken Quetschung des Halsmarkes, so daß sichere Reaktionen nicht mehr zu erhalten sind. Wir sind deshalb schon in früheren Versuchen[9] dazu übergegangen, die vasalen Kommunikationen im Brustraum zu unterbinden. Die Unterbrechung der arteriellen Versorgung des

Kopfes gelingt relativ leicht durch Unterbindung des Truncus brachiocephalicus und der Art. subclav. sinistra. — Die ursprünglich gehegte Hoffnung, auf der venösen Seite mit einer Unterbindung der V. cava cranialis (superior) auszukommen, erwies sich als falsch; bei diesen Versuchen kam es zu einem fast vollständigen „Verbluten" des Spenders in den Empfänger. Erst nach Unterbindung der kleinen Venen, die im Brustraum von dorsal in die V. cava caudalis (inferior) münden, konnte eine vollständige und sichere Unterbrechung der Gefäßverbindungen zwischen Rumpf und Körper des Versuchshundes (Empfänger) gesichert werden. Die Funktionsfähigkeit derartiger Präparate, über die allgemeine Ausführungen schon an anderer Stelle gemacht wurden[9], ist gut, sie liefern über 3 Std völlig gleichmäßige Resultate. — Bedauerlicherweise ist beim isolierten Kopf, dessen Blutversorgung ausschließlich über die anastomosierten Carotiden verläuft, eine Druckentlastung des Carotis-Sinus durch mechanische Abklemmung in ihrem Effekt unsicher und ungleichmäßig; wir sind deshalb dazu übergegangen, die Druckentlastung im Spenderkreislauf durch iv. Injektionen von 2—5 $\gamma$/kg Isopropyl-Nor-Adrenalin (Aludrin) zu erzeugen; Acetylcholin erwies sich wegen seiner starken Wirkung auf Chemoreceptoren wenig vorteilhaft. Zur Erzielung von Blutdrucksteigerungen im Spenderkreislauf und am Carotis-Sinus des isolierten Kopfes wurde Nor-Adrenalin i.v. injiziert. Die Injektion von Nor-Adrenalin und Isopropyl-Nor-Adrenalin in den Kreislauf des Spenders erzeugt beim Empfänger als Ausdruck der Gegenregulation, die nur noch über eine Hemmung bzw. Enthemmung der sympathischen Kreislaufzentren bewirkt werden kann, ein spiegelbildliches Verhalten des Blutdruckes; diese Reaktionen laufen sehr gleichmäßig ab und können zu Auswertungszwecken herangezogen werden[9].

Die Dosierung des Megaphens, das aus den handelsüblichen Ampullen (0,025 : 5) entnommen wurde, wurde in allen Versuchen bewußt im Rahmen niedriger therapeutischer Dosen gehalten; bei den Hunden wurden Dosierungen von 0,065—1 mg/kg, bei den Katzen Dosierungen von 0,05—1 mg/kg eingesetzt; da der Effekt aller wirksamen Dosierungen mehrere Stunden anhielt, wurde in der Regel jedem Versuchstier nur eine einzige Dosis verabreicht.

## Ergebnisse.

*1. Eigenwirkung.* Alle in unseren Versuchen eingesetzten Dosierungen des Megaphens führten zu einer *Senkung* des mittleren *arteriellen Blutdruckes* (Abb. 1—6); gelegentlich lief der Blutdrucksenkung eine flüchtige Anstiegszacke voraus. Für die Aufstellung einer festen Beziehung zwischen Dosis und Wirkung reichen die von uns durchgeführten Versuche nicht aus. Es hat den Anschein, als ob das Ausmaß der Blutdrucksenkung mehr von der Ausgangssituation des Versuchstieres als von der Megaphendosis abhängt. Der Blutdruckabfall erfolgte in allen Versuchen relativ langsam, der tiefste Wert wurde erst nach 5—20 min erreicht. Auch der Wiederanstieg des Blutdrucks erfolgte sehr langsam; 5 Stunden nach der Megapheninjektion lag der Blutdruck in der Regel noch etwas unter dem Ausgangswert.

Die durch Megaphen hervorgerufene anhaltende Senkung des arteriellen Mitteldruckes hielt sich in erträglichen Grenzen, *Kollapswerte* (unter 60 mm Hg) wurden *nicht erreicht.* Der mittlere Ausgangsblutdruck betrug, berechnet aus 28 Hunde-

versuchen 146,2 mm Hg ($\sigma = 10{,}3$); das Mittel der tiefsten Blutdruckwerte nach Applikation von Megaphen betrug 99,8 mm Hg ($\sigma = 12{,}1$). Die Berechnung des mittleren Ausgangsblutdruckes aus 9 Katzenversuchen ergibt einen Wert von 154,4 mm Hg (Grenzwerte: 195 mm Hg und 100 mm Hg), nach Megaphen betrug das Mittel der tiefsten Blutdruckwerte 92 mm Hg (Grenzwerte: 60 und 120 mm Hg).

Die durch Megaphen hervorgerufene Blutdrucksenkung konnte sowohl durch Infusion von Periston (bei der Katze) als auch durch Dauerinfusion von Nor-Adrenalin oder durch Injektion von 1-phenyl-2-methylaminopropan (Isophen) kompensiert werden (Abb. 1). Die zentralen Analeptica Pikrotoxin (0,2 mg/kg), Cardiazol (4 mg/kg), Coramin (10 mg/kg) und Coffein (20 mg/kg) hatten keinen wesentlichen Einfluß.

*2. Beeinflussung der Adrenalinwirkung.* Die auf Adrenalin eintretende Blutdrucksteigerung wurde durch alle oben genannten Megaphen-

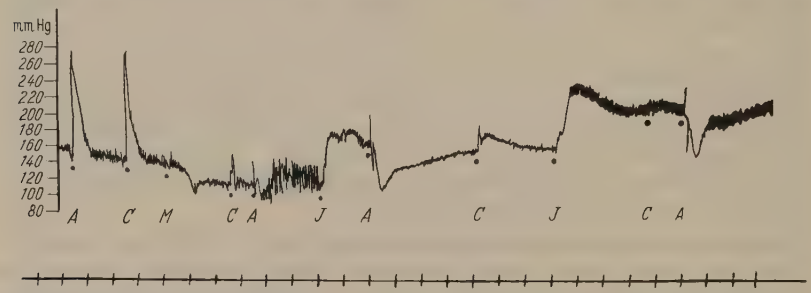



Abb. 1. *Adrenolytische und sympathicolytische Wirkung des Megaphens bei Aufhebung der Blutdrucksenkung durch Isophen.* Hund (11 kg) in Chloralose-Narkose. — Beide Vagi durchschnitten. — Blutdruck aus der Art. carotis. — Zeit in Minuten. — *A* 25 $\gamma$ Adrenalin; *C* Carotis-Sinus-Entlastung durch Abklemmen der freien Art. carotis communis für 30 sec; *M* 0,275 mg Megaphen; *I* 0,275 mg Isophen.

dosierungen auf ein Minimum reduziert, ausgelöscht oder umgekehrt (Abb. 1, 2). Als regelmäßiges Ereignis konnten wir die „Adrenalinumkehr" nicht feststellen; bei 4 Hunden und 3 Katzen war die pressorische Adrenalinwirkung lediglich ausgelöscht, eine „Umkehr" konnte während der ganzen Versuchsdauer nicht beobachtet werden. Bei den übrigen Tieren war die Adrenalinwirkung anfangs meist ausgelöscht, eine Umkehr wurde vielfach erst beobachtet, wenn die durch Megaphen hervorgerufene Blutdrucksenkung wieder rückläufig war oder wenn der Blutdruck durch Injektion von Isophen künstlich gesteigert worden war (Abb. 1). — Die durch Adrenalin hervorgerufene Nickhautkontraktion bei der Katze war nach Megaphen regelmäßig ausgelöscht (Abb. 3).

Die Reduktion der Adrenalinwirkung war von *sehr langer Dauer* (Abb. 2), eine völlige Restitution des Effektes war während der von uns gewählten Versuchszeiten (bis 5 Std) beim Hund nur einmal nach einer Dosis von 0,125 mg/kg zu registrieren. Bei den Katzenversuchen war die pressorische Adrenalinwirkung nach geringen Megaphendosierungen (bis 0,25 mg/kg) in $1^1/_2$—2 Std wiederhergestellt; nach höheren Dosierungen wurden zu einer völligen Restitution des Adrenalineffektes 4 Std benötigt.

*3. Beeinflussung der Nor-Adrenalinwirkung.* Der pressorische Effekt von Nor-Adrenalin wurde nicht so stark reduziert wie derjenige von Adrenalin (Abb. 2, 3), eine völlige Auslöschung oder eine Umkehr wurde in keinem Falle registriert. Betrachtet man den absoluten Gipfelwert des durch die Nor-Adrenalininjektion erreichten Blutdruckanstiegs, so läßt sich aussagen, daß der Nor-Adrenalineffekt sowohl bei den Hunden wie auch bei den Katzen reduziert war. Wählt man jedoch die durch Nor-

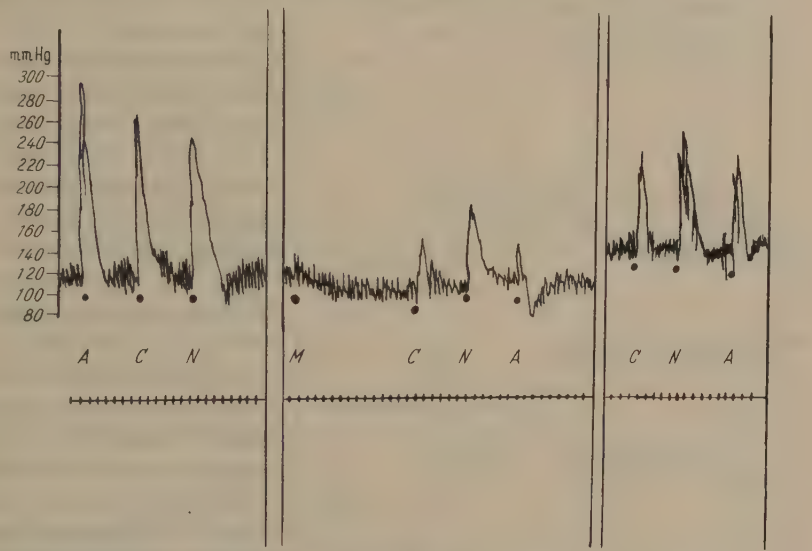



Abb. 2. *Antagonismus des Megaphens gegen Adrenalin, Nor-Adrenalin und die Carotis-Sinus-Entlastung.* Hund (7,4 kg) in Chloralose-Narkose. — Beide Vagi durchschnitten. — Blutdruck aus der Art. carotis; Zeit in 15 sec. — *A* 20 $\gamma$ Adrenalin; *C* Carotis-Sinus-Entlastung durch Abklemmen der freien Art. carotis communis für 20 sec; *N* 10 $\gamma$ Nor-Adrenalin; *M* 0,175 mg Megaphen. — Zwischen dem ersten und zweiten Teil der Kurve sind 20 min herausgeschnitten; zwischen dem zweiten und dritten Teil der Kurve 195 min.

Adrenalin erzielte Druckdifferenz als Maßstab, so ergibt sich nur aus den Hundeversuchen eine stets reproduzierbare Verminderung der Nor-Adrenalinwirkung; bei unseren Katzenversuchen konnte nur in 5 Fällen eine bewertbare Verminderung der durch Nor-Adrenalin erzielten Druckdifferenz festgestellt werden. Bei 2 Katzen, bei denen der Blutdruck nach Megaphen stärker abgefallen war, erwies sich die durch Nor-Adrenalin erzielte Druckdifferenz nach Megaphen sogar etwas größer als vorher.

Die Reduktion der Nor-Adrenalinwirkung durch Megaphen war in allen Versuchen rascher rückläufig, als die Verminderung des Adrenalineffektes. Bei den Katzenversuchen war innerhalb von 1—4 Std regelmäßig der ursprüngliche Effekt wieder zu erhalten. Bei den Hunden wurde eine völlige Wiederherstellung der pressorischen Wirkung von Nor-Adrenalin innerhalb von 5 Std nur 2mal beobachtet, in den übrigen Versuchen blieb trotz weitgehender Erholung eine mäßige, aber signifikante Abschwächung bestehen (Abb. 2).

*4. Beeinflussung der Carotis-Sinus-Entlastung.* Die durch eine C.S.E. ausgelöste reflektorische Blutdrucksteigerung wurde in allen Versuchen stark abgeschwächt oder ausgelöscht (Abb. 1—3). Dosierungen über 0,5 mg/kg Megaphen führten sowohl bei Hunden als auch bei Katzen zu einer fast vollständigen Auslöschung des Effektes; geringere Dosierungen führten entweder auch zu einer Auslöschung oder zu einer Abschwächung auf 25—50%. Die Reduktion der C.S.E.-Reaktion war unabhängig von dem Ausmaß der durch Megaphen bewirkten Blutdrucksenkung; auch in Versuchen, in denen der arterielle Blutdruck nur unwesentlich abgefallen war, zeigte sich eine fast völlige Auslöschung (Abb. 2). Trotzdem haben wir in einigen Versuchen den Blutdruckabfall durch verschiedene Maßnahmen kompensiert. Zwei Katzen erhielten eine Infusion von Periston, bei einer Katze und einem Hund wurde der Ausgangsblutdruck durch eine gesteuerte Dauerinfusion von Nor-Adrenalin wiederhergestellt, 3 Hunde erhielten 0,25—0,5 mg/kg Isophen i.v. Obwohl es in allen diesen Versuchen gelang, den Blutdruckabfall völlig zu kompensieren, kam es in keinem Fall zu einer signifikanten Verbesserung des Effektes der C.S.E. (Abb. 1). — Die Wiederherstellung der C.S.E.-Reaktion verlief in allen Versuchen etwas langsamer als die Wiederherstellung der Reaktion auf Nor-Adrenalin (Abb. 2); eine völlige Restitution wurde nur in 3 Hundeversuchen beobachtet.

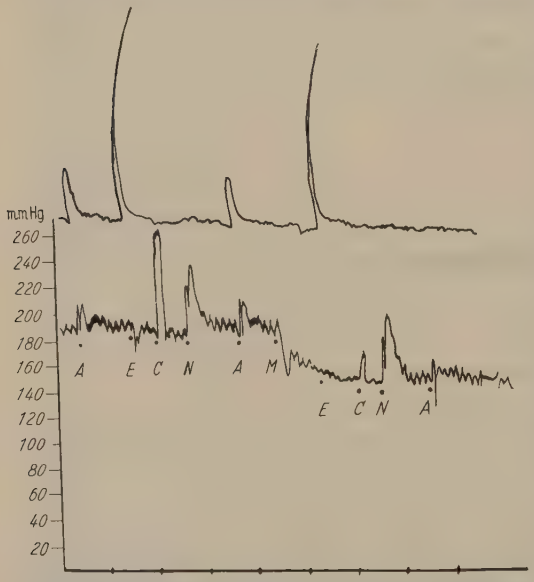



Abb. 3. *Adrenolytische, sympathicolytische und ganglioplegische Wirkung des Megaphens.* Katze (1,7 kg) in Chloralose-Urethan-Narkose. — Beide Vagi durchschnitten. — Obere Kurve: Nickhautkontraktionen; untere Kurve: Blutdruck. - Ganz unten die Zeit in 5 min. — *A* 3,4 $\gamma$ Adrenalin; *E* Präganglionäre elektrische Reizung des Halssympathicus (5 sec); *C* C.S.E. durch Abklemmen der freien Art. carotis communis für 1 min; *N* 3,4 $\gamma$ Nor-Adrenalin; *M* 0,425 mg Megaphen.

Wesentlich erscheint die in allen Versuchen registrierte Tatsache, daß der Effekt der C.S.E. nach Megaphen stärker abgeschwächt war als die Wirkung einer vorher äquivalenten Dosis von Nor-Adrenalin (Abb. 2, 3). Die Reduktion der C.S.E. glich im Ausmaß während 1—1½ Stunden vielfach derjenigen von Adrenalin; wenn der Adrenalineffekt ausgelöscht oder umgekehrt war, war auch der Effekt der C.S.E. gelöscht (Abb. 1—3);

im späteren Verlauf der Versuche wurde aber die Wirkung der C.S.E. meist rascher und besser wieder hergestellt als diejenige von Adrenalin.

*5. Präganglionäre Nickhautreizung.* Der Effekt einer präganglionären elektrischen Reizung des Halssympathicus auf die Katzennickhaut wurde durch Megaphen in Dosierungen über 0,25 mg/kg mäßig reduziert, aber nicht ausgelöscht (Abb. 3). Geringere Dosierungen hatten keine Wirkung.

*6. Beeinflussung des Vagusreizes.* Der am Blutdruck und am Darm von Hunden registrierte Effekt einer elektrischen Reizung des Halsvagus wurde durch Megaphen in Dosierungen von 1 mg/kg in keinem Falle abgeschwächt; in 4 Versuchen, in denen die Vagusreizung vor Megaphen keine sicher reproduzierbare Darmerregung hervorgerufen hatte, war diese nach Megaphen gut zu erhalten.

*7. Versuche am isolierten Kopf.* Die Injektion von Megaphen erfolgte stets in die Art. carotis des gekreuzten Kreislaufes; die Dosis betrug (berechnet auf das Körpergewicht des Spenders) 1 mg/kg. Bei 3 Versuchen, in denen der Carotis-Sinus des eigentlichen Versuchshundes (Empfänger) intakt gelassen war, kam es während der Megapheninjektion im Kreislauf des Empfängers 2mal zu einer Anstiegszacke des Blutdrucks, die in einem Fall ein erhebliches Ausmaß annahm (Abb. 4). Im weiteren Verlauf kam es beim Empfänger zu einer allmählich verlaufenden mäßigen Blutdrucksenkung; eine erhebliche Depression wurde nur in einem Versuch registriert (Abb. 5). Eine sichere, sofort nach der Injektion eintretende Blutdrucksenkung konnte im Empfängerkreislauf nur dann festgestellt werden, wenn die Carotis-Sinus des Empfängers zuvor denerviert waren (Abb. 6). — Der Blutdruck des Spenders wurde durch die Megapheninjektion genau so wie bei Versuchen am Einzeltier stets erniedrigt (Abb. 4—6). Die bei intaktem Carotis-Sinus am Blutdruck des Emp-

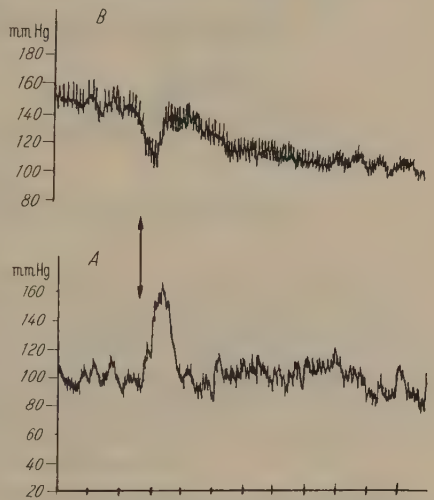



Abb. 4. *Endoanaesthetische Wirkung des Megaphens, registriert am gekreuzten Kreislauf nach* HEYMANS. Obere Kurve: Blutdruck aus der Art. femoralis des „Spenders" (*B*); Körpergewicht des „Spenders": 13,7 kg. — Untere Kurve: Blutdruck aus der Art. femoralis des „Empfängers" (*A*); Körpergewicht des „Empfängers": 6,7 kg. — Unten die Zeit in Minuten. — Zwischen Kopf und Rumpf des Empfängers ist als einzige Kommunikation das Halsmark erhalten geblieben. — Beim Zeichen wurden 13,7 mg Megaphen in die Art. carotis des gekreuzten Kreislaufs injiziert.

fängers auftretenden Gegenregulationen auf Drucksteigerung und Drucksenkung im Spenderkreislauf (s. Methodik) waren nach Megaphen ausgelöscht (Abb. 5).

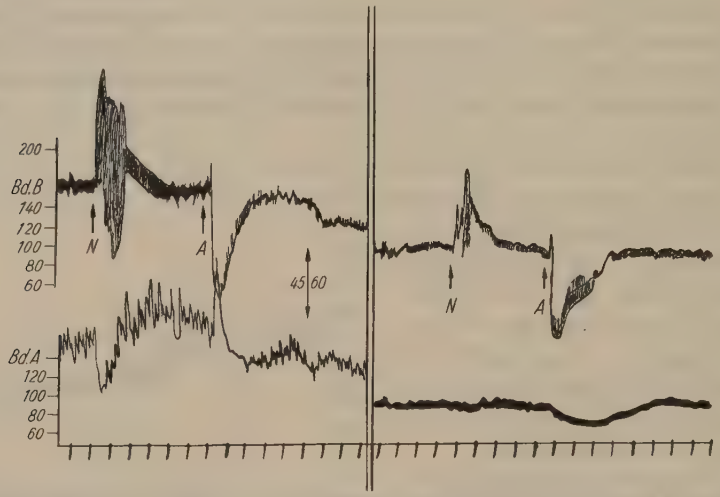



Abb. 5. *Wirkung des Megaphens auf Gegenregulationsvorgänge, registriert am gekreuzten Kreislauf nach* Heymans. Obere Kurve: Blutdruck des „Spenders" (*B*); Körpergewicht des „Spenders" 20,4 kg. — Untere Kurve: Blutdruck des „Empfängers" (*A*); Körpergewicht des „Empfängers" 13,4 kg. — Zeit in Minuten. — Zwischen Kopf und Rumpf des „Empfängers" (*A*) ist als einzige Kommunikation das Halsmark erhalten geblieben. — *N* 40 $\gamma$ Nor-Adrenalin i.v. in den Kreislauf des „Spenders" (*B*); *A* 40 $\gamma$ Isopropyl-Nor-Adrenalin (Aludrin) i.v. in den Kreislauf des „Spenders" (*B*); 4560 20,4 m Megaphen in die Art. carotis des gekreuzten Kreislaufs. — Zwischen den beiden Abschnitten der Abbildung sind 20 min herausgeschnitten.

## Besprechung der Ergebnisse.

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß schon sehr geringe Dosierungen von Megaphen einen allgemeinen Antagonismus gegen Erregungszustände des sympathischen Nervensystems ausüben, während ein dämpfender Einfluß auf das parasympathische System bei diesen Dosierungen nicht festgestellt werden kann. Es hat im Gegenteil den Anschein, als ob Megaphen durch Dämpfung des Antagonisten eine Parasympathikuserregung eher begünstigt als hemmt. Diese Auffassung steht im Einklang mit klinischen Versuchen, die Brass[1] am Hunde durchgeführt hat. Hier erwies sich die Kombination von Megaphen mit dem parasympathisch erregenden Polamidon wegen der starken Vaguserregung nur unter Zugabe von Parasympathikolytica als erträglich.

Unsere Befunde über die sympathicusdämpfende Wirkung des Megaphens zeigen ferner, daß das Megaphen nicht nur als „Adrenolyticum" angesehen werden darf. Megaphen reduziert den Effekt der C.S.E. ebenso stark wie denjenigen einer Adrenalininjektion; es muß deshalb im Sinne der Definition von Heymans[4] und Vleeschhouwer[16] sowohl als Sympathicolyticum wie auch als Adrenolyticum angesehen werden.

Für die starke Hemmung der C.S.E.-Reaktion durch Megaphen kann, da der Effekt des Überträgerstoffes Nor-Adrenalin erheblich weniger gedämpft wird, die periphere adrenolytische Wirkungskomponente nicht allein oder hauptsächlich verantwortlich gemacht werden. Dagegen spricht insbesondere die Tatsache, daß der Effekt einer Nervenerregung, wobei der Überträgerstoff gewissermaßen „gezielt" freigesetzt wird, durch überwiegend peripher angreifende Lytika schwieriger an-

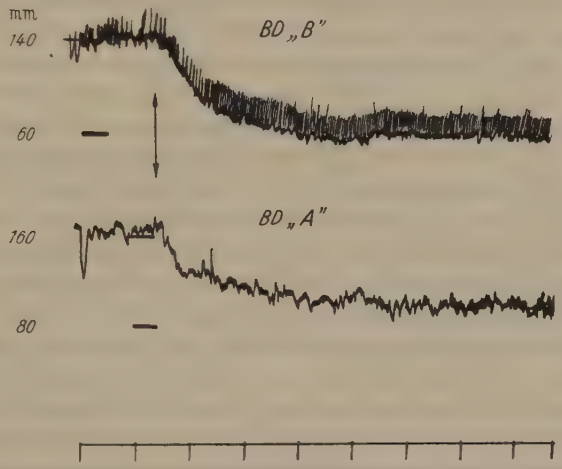



Abb. 6. *Depressorische Wirkung des Megaphens bei denerviertem Carotis-Sinus, registriert am gekreuzten Kreislauf nach* HEYMANS. Obere Kurve: Blutdruck des „Spenders" (*B*); Körpergewicht des „Spenders" 18,1 kg. — Untere Kurve: Blutdruck des „Empfängers" (*A*); Körpergewicht des „Empfängers" 9,2 kg. — Zeit in Minuten. — Beim Zeichen wurden 18,1 mg Megaphen in die Art. carotis des gekreuzten Kreislaufs injiziert.

tagonistisch zu beeinflussen ist als die Wirkung eines injizierten Überträgerstoffes; dies gilt sowohl im Bereich des sympathischen als auch des parasympathischen Systems. — Der wesentliche Angriffspunkt für die starke Hemmung des pressorischen Effektes der C.S.E. dürfte demnach nicht an den peripheren neuroeffektorischen Synapsen, sondern an einer anderen Stelle des Reflexbogens zu suchen sein. Die Entscheidung, an welcher Stelle dieser Angriffspunkt zu wählen ist, fällt schwer, da Megaphen außer einem peripheren adrenolytischen Effekt sowohl zentrale, wie auch ganglioplegische und lokalanaesthetische Wirkungskomponenten besitzt, die sämtlich in Betracht zu ziehen sind. Eine Hemmung der Reizübertragung in den sympathischen Ganglien ist mehrfach nachgewiesen worden[2, 3, 15]; sie erscheint aber bei den von uns eingesetzten Dosierungen nicht ins Gewicht zu fallen, da die Hemmung der Nickhautkontraktion auf präganglionäre elektrische Reizung des Halssympathicus nur so schwach ausgeprägt war, daß man sie aus der peripheren adrenolytischen Wirkung erklären kann. Ein zentraler Angriffspunkt für die sympathicusdämpfende Wirkungskomponente des Megaphens ist da-

gegen durch unsere Versuche am isolierten Kopf erwiesen, wo Megaphen bei enthemmtem Blutdruck eine starke depressorische Wirkung aufwies und bei erhaltenen Pressoreceptoren die Gegenregulation gegen Veränderungen des im Carotis-Sinus herrschenden Druckes dämpfte. Die Auffassung, daß die sympathicolytische Wirkung des Megaphens wesentlich auf einer Dämpfung der sympathischen (pressorischen) Anteile der zentralen Kreislaufregulation beruht, steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kalkoff[7] am Sinuspräparat des Hundes.

Von einer gewissen Bedeutung dürfte weiterhin der auf der lokalanaesthetischen Wirkungskomponente beruhende endoanaesthetische Effekt sein. Die bei einzelnen Hunden und auch am isolierten Kopf gelegentlich beobachtete primäre Blutdrucksteigerung ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Folge einer Dämpfung der pressoreceptorischen Nervenendigungen im Carotis-Sinus. Es ist, wie auch Kalkoff vermutet, wahrscheinlich, daß die Dämpfung der Erregbarkeit der Pressoreceptoren zum Teil maßgebend dafür ist, daß der Blutdruckabfall nur langsam und kaum bis auf Kollapswerte erfolgt. Es ist aber wenig wahrscheinlich, daß die endoanaesthetische Wirkung überwiegend für die Hemmung der Carotis-Sinus-Entlastung verantwortlich ist. Denn die endoanaesthetische Wirkung des Megaphens tritt sofort nach der Injektion ein, während der Blutdruckabfall und die Hemmung des Blutdruckanstiegs bei C.S.E. sich erst nach einer Latenzzeit von 5—15 Minuten voll ausbilden.

Die Tatsache, daß das Megaphen eine starke sympathicolytische und adrenolytische Wirkung ausübt, ohne den Blutdruck auf Kollapswerte zu erniedrigen, könnte wesentlich für die Erklärung der therapeutischen Effekte beim hämorrhagischen Schock und beim protoplasmatischen Kollaps sein. Laborit[17] hatte zur Verhinderung der deletären Arteriolenkontraktion zunächst Adrenolytica und Hydergin sowie Ganglioplegica eingesetzt. Die Unwirksamkeit der Adrenolytica erklärt sich zwanglos aus der Tatsache, daß sie in verträglichen Dosierungen nur einen geringen Antagonismus gegen pressorische Kreislaufreflexe aufweisen. Hydergin kann zwar genau so wie Megaphen als Sympathicolyticum und Adrenolyticum betrachtet werden, die sicher und voll wirksamen Dosierungen dieses Pharmakons liegen jedoch bereits im toxischen Bereich. Ganglioplegica führen zwar zu einer sicheren Hemmung reflektorischer Vasoconstrictionen, sie haben aber keinen adrenolytischen Effekt; ihre Wirkungsdauer ist verhältnismäßig kurz, und hohe, vollwirksame Dosierungen führen oft zu einem unerwünscht starken Blutdruckabfall. — Megaphen ist tatsächlich der einzige bekannte Stoff, der in therapeutischen Dosierungen eine weitgehende sympathicolytische und adrenolytische Wirkung ausübt. Es erscheint möglich, daß die besonders günstige Wirkung des Megaphens bei der Behandlung und Prophylaxe des protoplasmatischen Kollaps im wesentlichen hiermit zusammenhängt.

Als „Kuriosum" mag noch angeführt werden, daß unsere Ergebnisse ein schönes Beispiel für die Möglichkeit von Fehlschlüssen aus „Gegenschaltversuchen" geben. Holtz hatte die Auffassung, daß bei der reflektorischen Sympathicuserregung durch eine C.S.E. im wesentlichen Nor-Adrenalin freigesetzt wird, aus der gleichartigen Beeinflussung der C.S.E. und des Nor-Adrenalins durch das Adrenolyticum Yohimbin abgeleitet. — Die Gegenschaltung des Megaphens hätte bei der größeren Ähnlichkeit zwischen Adrenalin und der C.S.E. am Bild der Blutdruckkurve unter Umständen zu einer falschen Auffassung führen können.

In zweierlei Hinsicht dürften unsere Befunde auch eine direkte praktische Bedeutung besitzen. Marquardt[13] vertritt die Ansicht, daß man die sogenannte „Adrenalinumkehr" nach Megaphen als Test für die Vollständigkeit des Effektes verwenden könne. Die in unseren Versuchen verwandten Dosierungen lagen unter den therapeutisch angewandten und führten in keinem Fall zu einer Vertiefung der recht flachen Chloralose-Narkose. In klinischen Versuchen beim Hund benötigte Brass[1] zur Verstärkung narkotischer und hypnotischer Effekte Dosierungen von 1—2 mg/kg Megaphen intravenös. Es ist demnach sicher, daß die sympathicolytische und adrenolytische Wirkung des Megaphens schon bei solchen Dosierungen in Erscheinung tritt, die zur Erzielung einer „potenzierten Narkose" nicht ausreichen. Es ist deshalb nicht möglich, die ohne Frage bedeutsame sympathicolytisch-adrenolytische Wirkung des Megaphens für alle mit diesem Pharmakon erzielten Effekte verantwortlich zu machen; ferner erscheint der Versuch einer Kontrolle der Megaphenwirkung mit Hilfe der „Adrenalinumkehr" als ein unsicherer Test.

Wesentlich für die praktische Bekämpfung eventuell durch Megaphen verursachter Kreislaufzwischenfälle erscheint schließlich der Befund, daß zentrale Analeptica in subkonvulsiven Dosierungen keine blutdrucksteigernde Wirkung besitzen. Eine Steigerung des erniedrigten Blutdrucks scheint nur durch Auffüllung des Kreislaufs oder durch Sympathicomimetica möglich. Wir haben mit Dauerinfusion von Nor-Adrenalin und Einzelinjektionen von Isophen Erfolge erzielt, möchten aber annehmen, daß prinzipiell alle Sympathicomimetica geeignet sind, die keine oder nur eine schwache vasodilatatorische Wirkungskomponente haben und deren pressorische Wirkung durch Adrenolytica nicht umgekehrt wird.

## Zusammenfassung.

Es wird über Versuche an Hunden und Katzen zur Aufklärung der sympathicusdämpfenden Wirkung des Megaphens (0,05—1 mg/kg) berichtet.

1. Megaphen führt zu einer langsam eintretenden Blutdrucksenkung, deren Ausmaß verschieden sein kann; Kollapswerte (unter 60 mm Hg) sind kaum zu erwarten.

2. Megaphen führt zu einer sehr starken Reduktion oder Auslöschung des Effektes der C.S.E.; die Adrenalinwirkung wird in gleichem Maße abgeschwächt, aufgehoben oder umgekehrt. Der Antagonismus des Megaphens gegenüber injiziertem Nor-Adrenalin ist wesentlich geringer als derjenige gegen die Carotis-Sinus-Entlastung und Adrenalin.

3. Megaphen muß sowohl als Sympathicolyticum wie auch als Adrenolyticum angesehen werden. Die voll sympathicolytisch und adrenolytisch wirksamen Dosierungen sind niedriger als diejenigen, die zur Erzielung einer „potenzierten Narkose" benötigt werden.

4. Nach Versuchen am isolierten Kopf, der über einen gekreuzten Kreislauf nach Heymans versorgt wird, ist es wahrscheinlich, daß die sympathicusdämpfende Wirkung des Megaphens zum großen Teil über einen zentralen Angriffspunkt zustande kommt.

5. Versuche mit präganglionärer elektrischer Reizung des Halssympathicus und Registrierung der Nickhautkontraktion bei der Katze zeigen nur eine geringe Abschwächung des Effektes durch Megaphen. Diese Abschwächung läßt sich zwanglos aus der adrenolytischen Wirkung erklären. Es hat nicht den Anschein, als ob die ganglioplegische Wirkungskomponente des Megaphens dabei eine wesentliche Rolle spielt.

6. Zur Bekämpfung von Kreislaufzwischenfällen unter der Einwirkung von Megaphen erscheint neben der Auffüllung des Kreislaufs in erster Linie die Applikation von Sympathicomimetica geeignet.

7. Dosierungen von Megaphen, die eine fast vollständige sympathicolytische Wirkung ausüben, zeigen keinen Antagonismus gegen die Blutdruck- und Darmwirkung einer elektrischen Vagusreizung.

## Literatur.

[1] Brass, W.: Dtsch. tierärztl. Wschr. (im Druck).. — [2] Brunand, M., S. Brunaud et Ph. Décourt: C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 1764 (1953). — [3] Courvoisier, S., I. Fournell, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschel: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — [4] Heymans, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 114 (1952). — [5] Heymans, I. F., u. C. Heymans: Abderhalden Handb. Abt. V, Teil 2/II 1075. — [6] Huidobro, F.: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 308 (1954). — [7] Kalkoff, W.: Verh. dtsch. pharmak. Ges. Saarbrücken 1954. — [8] Krause, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 212 (1954). — [9] Krause, D., D. Ruhnau, W. Brass, K. D. Günther u. G. Varela: Mh. Vet.-med. **14**, 306 (1953). — [10] Kroneberg, G., u. I. D. Achelis: Arzneimittel-Forsch. **4**, 270 (1954). — [11] Lendle, L., H. Mercker u. H. Rohr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 352 (1953). — [12] Marquardt, P., u. H. Schumacher: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 74 (1954). — [13] Marquardt, P., u. H. Schuhmacher: Arzneimittel-Forsch. **4**, 223 (1954). — [14] Sutton, G. C., A. Cerletti et M. Taeschler: Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 393 (1950). — [15] Vanlerenberrghe, I., A. Robelet et G. Milbled: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 421 (1954). — [16] Vleeschhouwer, G. de: Over Sympathicolytica en Adrenolytica Thesis (1950). — [17] Weese, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 17 (1954).

Priv.-Doz. Dr. D. Krause, Hannover, Pharmakol. d. Tierärztl. Hochschule.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 255—261 (1955).

# Der mikrochemische Arsennachweis und seine Brauchbarkeit zur Identifizierung von Menstruationsblut.

Von

K. Thoma, A. Schöntag, E. Kuchinke.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 6. Mai 1955.)*

Das physiologische Vorkommen von Arsen im menschlichen Organismus ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion. Die Untersuchungen von Seifert[1] sprechen dafür, daß Arsen ein normaler Bestandteil der Gewebe und Körperflüssigkeiten ist. Eine gegensätzliche Ansicht vertritt Paulus[1]. Kingsley, Schaffert u. Roscoe[1] weisen zwar darauf hin, daß im allgemeinen kein Arsen im menschlichen Blut gefunden wird, konnten aber in eigenen Untersuchungen As-Werte von 3,5—7,2 $\gamma$-% im Serum feststellen.

Wir stellten uns — angeregt durch die Veröffentlichung von Guthmann u. Henrich — die Aufgabe, in Reihenuntersuchungen zu prüfen, ob der physiologische Blut-As-Spiegel zum Nachweis von Menstruationsblut im Rahmen der gerichtsmedizinischen Spurenexpertise herangezogen werden kann. Nach diesen Autoren beträgt nämlich der As-Gehalt des Kreislaufblutes bei der nicht menstruierenden Frau 63 $\gamma$-%. Zur Zeit der Periode findet eine Erhöhung auf 93 $\gamma$-% statt. Im Menstruationsblut selbst ist dagegen ein Anstieg auf 320 $\gamma$-% zu verzeichnen.

Bekanntlich ist der gerichtsmedizinische Experte bei der Identifizierung von Menstruationsblutspuren auf das Vorhandensein bzw. Fehlen glykogenhaltiger Scheidenepithelien angewiesen. Ein neueres Verfahren beruht auf dem bakteriologischen Nachweis der Döderleinschen Vaginalbazillen, dem Lactobacillus acidophilus, der normalerweise nur im Vaginalsekret der Frau vorhanden ist (Berg). Der positive Ausfall dieser Reaktionen berechtigt jedoch nur zu der generellen Annahme, daß die Blutung dem weiblichen Genitale entstammt, ohne daß eine Abgrenzung von Menstruationsblut gegenüber Blutungen bei Genitalverletzungen gewährleistet ist. Schließlich weist Berg noch auf die Möglichkeit hin, das im Menstruationsblut vorhandene fibrinolytische Ferment im extrahierten Spurenmaterial zu testen. Auch bei dieser Methode spricht jedoch nur der positive Befund, nämlich ein erhöhter Fibrinolysewert, für das Vorliegen von Menstruationsblut, während das negative Resultat keine Schlußfolgerung zuläßt.

Die Richtigkeit der Ergebnisse von Guthmann u. Henrich vorausgesetzt, müßte es ohne Schwierigkeit möglich sein, eine Identifizierung von Kreislauf- und Menstruationsblut mit den zum Arsen-Nachweis zur

[1] Dort weitere Literatur.

Verfügung stehenden Mikromethoden zu erreichen. Nach Seifert liegt der physiologische As-Spiegel des Blutes allerdings nur um etwa 20 $\gamma$-%, wobei es sich bereits um Höchstwerte handelt. Er verweist auf die erheblichen individuellen Schwankungen. In zahlreichen Fällen finden sich im Blut As-Werte, die unter 0,1 $\gamma$-% liegen und mit der von ihm verwendeten Testfleckenmethode nicht mehr feststellbar sind. Die Inangriffnahme der Untersuchungen erschien trotzdem erfolgversprechend, da eine Anreicherung von Arsen im Menstruationsblut tatsächlich zu bestehen scheint (Müller, Hinsberg). Nach Jaschke-Pankow ist sogar mit einem mehr als 5mal so hohen As-Gehalt zu rechnen. Somit war zu erwarten, daß mit einer empfindlichen, exakt arbeitenden Mikromethode selbst dann noch ein positiver As-Befund im Menstruationsblut gelingt, wenn Arsen im Kreislaufblut in unterschwelliger, nicht mehr nachweisbarer Konzentration vorhanden ist.

Im Hinblick auf die Geringfügigkeit des Untersuchungsmaterials bei der Auswertung von Menstruationsblutspuren suchten wir die Empfindlichkeit der Nachweisreaktion, die Seifert mit 0,1 $\gamma$ As angibt, weiter zu steigern. Zu diesem Zweck arbeiteten wir eine eigene Bestimmungsmethode zur Erfassung auch geringster Arsen-Spuren aus, die sich eng an die Testfleckenmethode von Seifert anlehnt.

## Methodik.

Nach Feigl können bei Verwendung von Gold-III-chlorid noch 0,05 $\gamma$ Arsen erfaßt werden. Der Nachweis beruht auf der bekannten Umsetzung von Arsenwasserstoff mit Goldchlorid. Die dem As-Gehalt der zu untersuchenden Lösung analoge Reduktion des Goldchlorids dokumentiert sich in einer verschieden intensiv ausgeprägten violetten bis schwarz-violetten Verfärbung des mit einer 1%igen Gold-III-chlorid-Lösung getränkten Testpapiers. Der Reaktionsablauf geht nach folgender Gleichung vor sich:

$$AsH_3 + AuCl_3 + 3\,H_2O = Au + 3\,HCl + H_3AsO_4.$$

Die zunächst angesetzten Vorversuche wurden mit der Orginalapparatur von Seifert (1952) durchgeführt. Eine Abweichung bestand lediglich darin, daß das zwischen den Flanschen gepreßte Filterpapier an Stelle von Silbernitrat mit Goldchlorid getränkt war. Die mit der Seifertschen Versuchsanordnung erzielten Ergebnisse waren jedoch nicht zufriedenstellend, da die Farbintensität der Testflecken im Grenzkonzentrationsbereich zu großen Schwankungen unterworfen war. Als mögliche Fehlerquelle erwiesen sich z. B. die Schlauchverbindungen zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen. Ferner zeigte sich, daß die verhältnismäßig große Apparatur bei niedrigen Konzentrationen keine Gewähr mehr bot, die untere Nachweisbarkeitsgrenze zu erreichen. Zur Ausschaltung dieser störenden Faktoren entwickelten wir eine neue Apparatur, die den gestellten Anforderungen gerecht wurde. Das Reaktionsgefäß wurde von der Fa. Bender & Hobein, München, nach Angabe hergestellt. (Abb. 1).

Bei den Versuchen verwendeten wir das Filterpapier Nr. 604 der Fa. Schleicher & Schüll, das bei Vorbehandlung mit Goldchlorid keine Reaktion aufweist und über einen genügenden Porositätsgrad verfügt, um die entwickelten Gase austreten zu lassen. Ein aus diesem Testpapier kreisförmig ausgeschnittenes Stück von etwa

1,5 cm Durchmesser wird in 1%iger Goldchloridlösung getränkt und im Dunkeln getrocknet. Die Aufbewahrung der derart präparierten Papiere muß ebenfalls im Dunkeln erfolgen, da Lichteinwirkung Verfärbungen hervorruft.

Zur Ausführung der Reaktion wird das Testpapier zwischen die beiden Glasflanschen gelegt, die durch 2 Spiralfedern fest miteinander verbunden sind. Etwa vorhandener Schwefelwasserstoff wird durch die in dem mittleren Gefäß (vgl. Abb. 1) befindliche 10%ige Cadmiumsulfat Lösung (etwa 3 $cm^3$) abgebunden. Nunmehr beschickt man das Reaktionsgefäß mit 6 $cm^3$ 20%iger Schwefelsäure und 0,1 $cm^3$ 10%iger Kupfersulfatlösung. Nach Einpipettieren der je nach der gewählten Konzentration vorbereiteten Arsentestlösung werden abschließend 3 Zink-Granula (Merck, Zn für forensische Zwecke) zugegeben.

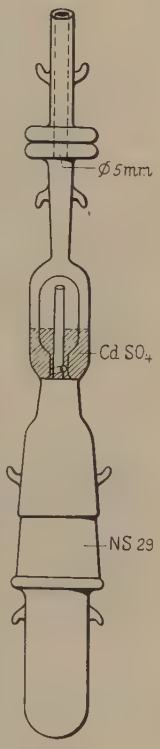


Abb. 1.

Um die Versuchsbedingungen optimal zu gestalten, wurde sowohl der zeitliche Ablauf der Reaktion variiert, als auch der Einfluß der Temperatur geprüft. Es sei hier nicht auf Einzelheiten der langwierigen Versuchsreihen eingegangen, sondern abschließend nur festgestellt, daß die Empfindlichkeit der Reaktion im Dunkeln bedeutend gesteigert und die Erreichung der Grenzkonzentration bei einem Reaktionsablauf von 60 min gewährleistet ist. Bei Ausführung der Reaktion mit sehr geringen Arsenmengen ($< 1\,\gamma$) ist darauf zu achten, daß bei jedem Versuch annähernd gleiche Mengen von Schwefelsäure und Kupfersulfat vorgelegt werden. Die verwendeten Reagentien ($H_2SO_4$, $CuSO_4$, Zn-Granula) müssen im Leerversuch auf etwaige störende Arsen-Verunreinigungen überprüft werden. Selbst geringfügige methodische Abweichungen liefern bei der Empfindlichkeit der Reaktion unterschiedliche Resultate.

Nach Ausschaltung der die Reaktion störenden Faktoren stellten wir zunächst mit eingewogenen Arsenmengen eine Standardtestfleckenreihe her. Die Reaktionsgefäße wurden sofort nach Zugabe der Zink-Granula ins Dunkle gestellt, die Testpapiere nach Ablauf von 60 min entnommen. Die Testflecken von 5 mm Durchmesser waren in einem der Arsenmenge entsprechenden violetten bis schwarz-violetten Farbton deutlich konturiert ausgebildet.

Zur Bestimmung von unbekannten Arsenmengen im Blut wurde dieses nach der üblichen Methode in Quarzkölbchen mit 2 $cm^3$ konz. Schwefelsäure unter Zusatz von rauchender Salpetersäure verascht. Die Aufschlußlösung wurde mehrfach mit bidest. Wasser (Ampuwa) zur Entfernung der Nitrosylschwefelsäure abgedampft und anschließend in einem geeichten Glaskolben mit bidest. Wasser auf 10 $cm^3$ aufgefüllt, so daß eine 20%ige schwefelsaure Lösung zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung stand. Von dieser Lösung wurden 6 $cm^3$ — wie beschrieben — auf Arsen getestet.

Um Fehlermöglichkeiten auszuschalten, die bei visueller Beurteilung der Testflecken immer gegeben sind, wurde ein neuer Weg zu einer vom Auge unabhängigen Auswertung beschritten. Versuche ergaben, daß die quantitative Messung der Intensität der Testflecken mittels zweier voneinander unabhängiger Methoden möglich ist. Diese bestehen einmal in der direkten Bestimmung der Farbtiefe des Fleckens mit Hilfe der Messung des Reflexionsvermögens, zum anderen in der spektro-

graphischen Analyse des Fleckens durch Ausfotometrieren der Arsenlinie 2349,8 Å.

Die Farbtiefe der unterschiedlich tingierten Testflecken kann, wie der Versuch zeigte, nicht mit einem Pulfrich-Fotometer visuell gemessen werden, da hierbei zu große Fehlerwerte auftreten. Eine objektive Bestimmungsmöglichkeit ist jedoch mit Hilfe eines Selensperrschichtfotoelementes gegeben. Die zu diesem Zweck konstruierte einfache Meßeinrichtung (Abb. 2) entspricht völlig den gestellten Anforderungen. Als Lichtquelle dient eine 4 Volt-Lampe. Unter Zwischenschaltung einer Kondensorlinse (f =15 mm) werden die Strahlen auf den Testflecken zentriert und von dort auf das mit einem Galvanometer verbundene Selensperrschichtfotoelement reflektiert bzw. gestreut. Die Messung erfolgt in der Weise, daß der Arsen-

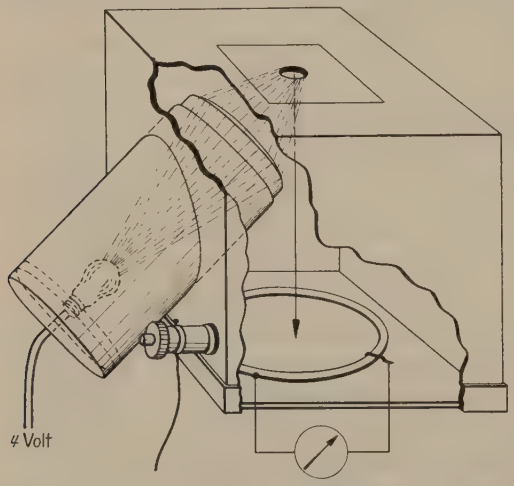



Abb. 2. Reflexions-Meßgerät zur Auswertung von Arsen-Testflecken. Der Testflecken wird mit der im Gehäusedach befindlichen Bohrung von 5 mm Durchmesser zur Deckung gebracht.

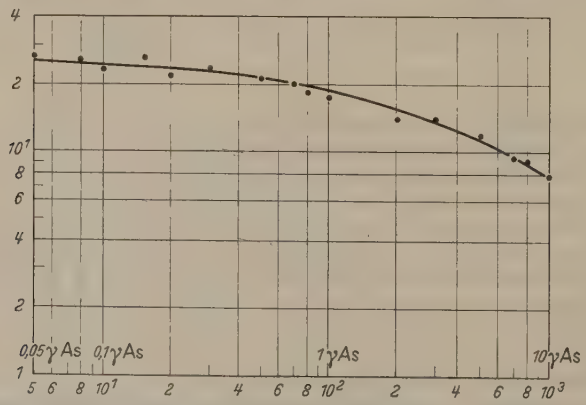



Abb. 3. Die Galvanometerausschläge der Testfleckenwerte sind gegen die As-Konzentration aufgetragen (beide im logarithmischen Maßstab). Die Testfleckenwerte sind auf konstante Leerwerte bezogen.

fleck *gegen* das unveränderte Ausgangspapier verglichen wird. Je größer der As-Gehalt der untersuchten Lösung, desto kleiner werden die Galvano-

meterausschläge (stromempfindliches Multiflex-Galvanometer von LANGE, 1 Skalenteil = $0{,}7 \cdot 10^{-9}$ Amp.). Durch die Auswertung zahlreicher Testflecken können die in Abb. 3 angegebenen Arsenkurvenpunkte erhalten werden. Die Kurve zeigt eine deutliche und stetige Abhängigkeit des Reflexionsvermögens der Arsentestflecken von der Arsenkonzentration in der Grenze von 0,05—10 $\gamma$ Arsen.

Die spektrographische Bestimmung der Arsenmengen reicht bis zu einem As-Gehalt von etwa 1 $\gamma$ (in Luft), hat also im Vergleich zur Reflexionsmessung eine geringere Empfindlichkeit. Dagegen bietet diese Methode den Vorteil der Gewißheit, daß der Fleck tatsächlich von Arsen verursacht worden ist, und nicht etwa von Blei, Cadmium oder Antimon. Versuche, die Empfindlichkeit des spektrographischen Nachweises durch Verwendung anderer Entladungsgase als Luft zu steigern (SCHÖNTAG), verliefen erfolgversprechend.

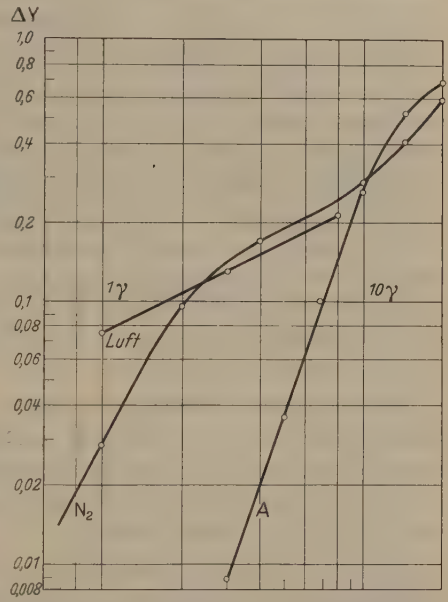



Abb. 4. Arsen-Eichkurven in Luft, Stickstoff und Argon in doppellogarithmischer Darstellung. Das Intensitätsverhältnis der As-Linie 2349,8 zur C-Linie 2478,6 ist gegen die As-Konzentration jeweils logarithmisch aufgetragen.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, gelingt es, bei Verwendung von Stickstoff als Entladungsgas zu noch etwas geringeren Arsenkonzentrationen als 1 $\gamma$ zu gelangen. Die Erfassungsgrenze liegt hierbei etwa bei 0,5 $\gamma$ As.

## Untersuchungsbefunde.

Bei der Besonderheit der Untersuchungen mußte der Kreis der Probanden naturgemäß klein bleiben, zumal nur Menstruationsblut verwendet wurde, das von den Versuchspersonen direkt in Glasgefäßen aufgefangen wurde. Es gelangten insgesamt Blutproben von 20 verschiedenen Personen zur Untersuchung. Die zur Verfügung stehenden Mengen schwankten zwischen 2—7 cm³. Gleichzeitig mit den Menstruationsblutproben wurden jeweils auch 10 cm³ vor Eintritt der Periode entnommene Venenblute getestet.

Die erzielten Ergebnisse entsprachen nicht der Erwartung. Die Prüfung des Kreislaufblutes auf Arsen verlief in allen Fällen negativ. Unter den Menstruationsblutproben befanden sich lediglich 3, die einen positiven As-Befund ergaben. Die Werte lagen um 0,05 und 0,06 $\gamma$ As. Zur Aufarbeitung standen Mengen von einmal 4 cm³ und zweimal 6 cm³ zur

Verfügung. In Nachuntersuchungen mit ungefähr der gleichen Blutmenge aus der folgenden Regelblutung blieb der As-Gehalt bei 2 Personen in gleicher Höhe nachweisbar, während er bei der 3. Person nicht mehr festgestellt werden konnte.

## Diskussion.

Unter Zugrundelegung der Arbeit von Guthmann u. Henrich sowie anderer Literaturhinweise war zu erwarten, daß der As-Gehalt des Menstruationsblutes genügt, um eine für die Praxis verwertbare Methode zur Bestimmung von Menstruationsblutspuren mittels der von uns modifizierten Testfleckenmethode auszuarbeiten. Wie einleitend erwähnt, geben die genannten Autoren As-Werte im Menstruationsblut bis zu 320 $\gamma$-% an. Unter dieser Voraussetzung müßte selbst beim Vorliegen von nur 1 cm³ Untersuchungsmaterial noch eine deutlich positive Reaktion im Testversuch eintreten, auch wenn berücksichtigt wird, daß wir aus technischen Gründen von 10 cm³ Aufschlußlösung nur 6 cm³ zum Arsen-Nachweis verwendeten[1].

Seifert gibt als Höchstwert für den physiologischen As-Spiegel im Kreislaufblut 24 $\gamma$-% an. Würde regelmäßig eine Erhöhung des As-Gehaltes im Menstruationsblut um etwa das 2—3fache eintreten, so ließe sich auch dieser Wert mit der von uns ausgearbeiteten Mikromethode noch ohne Schwierigkeit erfassen.

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen nun, daß der physiologische As-Gehalt des Kreislaufblutes bei allen 20 Versuchspersonen unter 1 $\gamma$-% liegen muß, da erst dann die Nachweisbarkeitsgrenze bei Aufarbeitung von 10 cm³ Vollblut (bezogen auf 6 cm³ Aufschlußlösung) unterschritten wird. Die 3 Fälle, in denen wir Arsen im Menstruationsblut im Grenzkonzentrationsbereich finden konnten, sprechen allerdings im Sinne einer Anreicherung von Arsen. Für die Praxis besitzt diese Feststellung jedoch keine Bedeutung.

## Zusammenfassung.

Es wird eine mikrochemische Testfleckenmethode zur Bestimmung von Arsen beschrieben. Das Verfahren gestattet noch 0,05 $\gamma$ As zu erfassen. Fehlermöglichkeiten sind durch die kombinierte Auswertung der Testflecken (Messung des Reflexionsvermögens, quantitative spektrographische Analyse) praktisch ausgeschlossen.

Trotz der hohen Empfindlichkeit der Reaktion ist es nicht möglich, den As-Gehalt geringer Blutmengen, wie sie in der gerichtsmedizinischen Praxis zur Verfügung stehen, zu testen. Eine Anreicherung von Arsen im Menstruationsblut kann zwar auf Grund der Versuchsergebnisse wohl

[1] Die restlichen 4 cm³ der Aufschlußlösung wurden zum mikrochemischen Kupfernachweis verwendet. (Vgl. Arch. Krim. 115, H. 3/4 61 (1955).

mit Recht vermutet werden, doch ist das Verfahren zur Identifizierung von Menstruationsblut im Rahmen der gerichtsmedizinischen Spurenexpertise nicht geeignet.

## Literatur.

Berg: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **42**, 605 (1954). — Feigl: Spot Tests, S. 81 (1947). — Guthmann u. Henrich: Arch. Gynäk. **172**, 380 (1941). — Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handb. d. physiol. u. pathol. chem. Anal., V. Bd., 10. Aufl., S. 12. Berlin-Heidelberg-Göttingen: Springer 1953. — Jaschke, v., u. Pankow: Lehrbuch der Gynäcologie, 5. Aufl., S. 72. Berlin 1933. — Kingsley, Schaffert u. Roscoe: Anal. Chem. **23**, 914 (1951). — Mueller: Gerichtl. Med. S. 638. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — Paulus: Beitr. ger. Med. **19**, 120 (1952). — Schöntag: Mikr. Chem. acta, z. Z. im Druck. — Seifert: Dtsch. med. Wschr. **1954**, 1122. — Seifert u. Brossmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 121 (1952).

Dr. med. Karl Thoma, München 34, Türkenstraße 4.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 262—268 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. Henning).

# Über den Verbleib von $^{131}$J markiertem Urografin im Körper*.

Von
K. H. Kimbel und W. Börner.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 5. Mai 1955.)*

Bei einer zu diagnostischen Zwecken einverleibten Substanz ist es wichtig, daß sie nach der beabsichtigten Untersuchung möglichst schnell ausgeschieden wird. Das trifft besonders für die stark jodhaltigen Nieren- und Gallenkontrastmittel zu, bei denen eine Abspaltung anorganischen Jods bei längerer Verweildauer sehr unerwünscht wäre. Die Markierung dieser Substanzen mit radioaktivem Jod ($^{131}$J) gibt uns die Möglichkeit, am Patienten und am Versuchstier zu prüfen, wie lange das jodhaltige Kontrastmittel oder abgespaltene Jodverbindungen im Körper verbleiben. Nach markiertem Biligrafin stand uns nun $^{131}$J etikettiertes Urografin (N,N′-diazetyl,3,5-diamino,2,4,6-trijodbenzoesäure)** als 12% Lösung mit etwa 1,7 mc/g zur Verfügung. Mit dem Präparat wurden Untersuchungen über die Ausscheidung am Menschen und Verteilungsversuche an 8 Ratten gemacht.

## Methodik.

*A. Tierversuche.* Acht 92—134 g schweren Albinoratten wurde jeweils 0,5 ml des $^{131}$J markierten Urografin (Natrium- und Methylglukaminsalz der N,N′-diazetyl, 3,5-diamino,2,4,6-trijodbenzoesäure) mit einer Aktivität von 70 $\mu$c in eine Schwanzvene injiziert. Nach 45, 90 min und 3 sowie 24 Std wurden je zwei Tiere mit 0,5 ml einer 10% Thiogenal-Lösung i.p. narkotisiert und nach Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle durch Herzpunktion entblutet. Die entnommenen Organe wurden mit 0,9 % NaCl-Lösung abgespült, mit Filtrierpapier abgetupft und gewogen. Sie wurden anschließend unter Zusatz von 50 ml physiologischer Kochsalzlösung im „Starmix" bei 12000 U/min homogenisiert und in einem Flüssigkeitszählrohr (15 ml) gemessen. Der gesamte Darm wurde zuvor mit 100 ml 0,9% NaCl-Lösung durchgespült, um Dünndarm- und Dickdarmwand getrennt vom Inhalt messen zu können. Der Mageninhalt wurde ebenfalls durch Ausstreifen und Spülen des Magens gewonnen und die Aktivität getrennt bestimmt.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Der Firma Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck, sind wir für die Überlassung eines Strahlungsmeßgerätes sehr verbunden.

** Herrn Prof. Junkmann, Schering AG, Berlin, danken wir für die Synthese und Überlassung des Präparates.

Die Messungen wurden mit einem Strahlungsmeßgerät (FH* 49 mit sechs elektronischen Untersetzerstufen (E 1 T) in Verbindung mit einer Bleikammer der gleichen Firma und Flüssigkeitszählrohren vom Typ FHZ* 41 durchgeführt. Es wurde jeweils 2mal 1 min gemessen, bei Impulszahlen unter 1000 Imp/min wurde die Meßzeit entsprechend verlängert. Für die Stunden bzw. einen Tag nach der Injektion gemessenen Werte wurde der Zerfall des $^{131}J$ entsprechend berücksichtigt. In Tab. 1 ist zu beachten, daß die Organaktivitäten auf 1 g Gewebe berechnet sind, der Darminhalt (mit Spülflüssigkeit) auf 100 ml Volumen. Für den Mageninhalt konnte keine Bezugsgröße angegeben werden.

*B. Versuche am Menschen.* Der Harn wurde 15, 30, 45 und 60 min p.i. nach der für Clearence-Untersuchungen üblichen Methode mit Verweilkatheter gewonnen. Die relative Aktivität im Blut wurde über dem Herzen mit einem Dreifach-Großflächen-Zählrohr der SRW** (0,8 cm starker Bleitubus von 20 $cm^2$ wirksamer Eintrittsfläche) über dem durch Perkussion lokalisierten Herzen gemessen und die über 10 sec integrierte Impulszahl mittels eines Dreifach-Linienschreibers*** registriert.

Nach vorherigem Absaugen wurde 10, 20, 30 und 40 min nach der Injektion der Magen- bzw. Duodenalsaft mittels Sonde gewonnen und gleichzeitig Speichel in einem kleinen Becherglas aufgefangen. Hierzu wurde die Versuchsperson angehalten, den gesamten Speichel in das Glas auszuspeien.

## Ergebnisse.

*A. Tierversuche.* Die in den Organhomogenaten nach 45, 90 min und 3 sowie 24 Stunden gemessenen Zerfallszahlen, absolut und auf Gramm Gewebe berechnet, sind in Tab. 1 dargestellt. Die Konzentration im Blut nimmt in den ersten 3 Std rasch ab, nach 24 Std liegen die Zerfallszahlen im Bereich des Zählrohrnulleffektes, es ist also praktisch keine markierte Substanz mehr im Blut nachweisbar. Die Messung im Plasma nach Abtrennung der Erythrocyten ergibt, daß die Hauptmenge der aktiven Substanz in letzteren vorliegt; der Plasmaanteil beträgt nur zwischen 20 und 36%. Wie beim Biligrafin (3) finden wir auch beim Urografin eine geringe Aktivität im Mageninhalt, der größte Teil der wiedergefundenen, d. h. nicht mit dem Harn ausgeschiedenen markierten Substanz liegt jedoch im Darminhalt vor. Er erreicht bei einem Tier nach 3 Std 79000 Imp/min, das sind fast 10% der Eingabe. Von den Organen ist die Wand des Dünn- und Dickdarmes, der wahrscheinlichen Exkretionsfunktion entsprechend, recht aktiv; auch in der Magenwand ist eine erhöhte Zerfallszahl nachzuweisen, die jedoch schneller abfällt als die des Dünn- und Dickdarmes, in denen nach 24 Std als einzigem Organ noch Aktivität zu messen ist. Auch das Fettgewebe nimmt markierte Substanz auf, gibt sie allerdings rasch wieder ab, nach 24 Std ist nichts mehr nachzuweisen. Die Zerfallszahl in der Niere war nicht so hoch wie erwartet; die ersten Tiere wurden allerdings zu einem Zeitpunkt (45 min) getötet, zu dem beim Menschen schon die Hauptmenge des Kon-

* Firma Frieske & Hoepfner, Erlangen-Bruck.
** Firma Siemens-Reiniger-Werke AG, Erlangen.
*** Firma Metrawatt, Nürnberg.

Tabelle 1. *Zerfallszahlen im Homogenat des genannten Organs bzw. in der Spülflüssigkeit. Obere Zahl absolute Impulszahl, untere Zahl Impulszahl pro Gramm Gewebe. Blutvolumen nach* Cartland *und* Koch *zu 6,7 ml/100 g Körpergewicht berechnet.*

| Tier Nr. | 1 (45) | 2 (45) | 3 (90) | 4 (90) | 5 (3 Std) | 6 (3 Std) | 7 (24 Std) | 8 (24 Std) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Blut | 26459 | 34083 | 22332 | 7919 | 1602 | 1722 | 159 | 191 |
| Plasma | 8002 | 12020 | 4756 | — | — | — | — | — |
| % in Erythroc. | 69,8 | 64,2 | 79,4 | | | | | |
| Mageninhalt | ∅ | ∅ | 5407 | 327 | 526 | 111 | 821 | 23 |
| Darminhalt | 42300 | 90270 | 25994 | 48558 | 35810 | 79094 | 50429 | 13606 |
| Dünndarm | 5891 | 11557 | 9596 | 2987 | 2567 | 1181 | 200 | 629 |
| | 867 | 1780 | 1440 | 503 | 347 | 159 | 50 | 87 |
| Dickdarm | 2660 | 3132 | 2640 | 1142 | 726 | 822 | 626 | 78 |
| | 607 | 678 | 600 | 241 | 165 | 286 | 117 | 21 |
| Magen | 1264 | 1584 | 1155 | 162 | 76 | — | — | — |
| | 1200 | 1940 | 1000 | 216 | 76 | — | — | — |
| Fett | 12728 | 1990 | 4967 | 858 | 165 | 647 | — | — |
| | 2450 | 311 | 730 | 95 | 35 | 62 | — | — |
| Niere | 18180 | 13662 | 21328 | 4040 | 1393 | 726 | — | — |
| | 11700 | 10200 | 12900 | 2450 | 800 | 371 | — | — |
| Milz | 535 | 281 | 661 | 122 | — | — | — | — |
| | 1670 | 685 | 838 | 207 | — | — | — | — |
| Leber | 40306 | 22612 | 34545 | 12491 | 6623 | 1980 | — | — |
| | 5190 | 3140 | 4830 | 1830 | 635 | 296 | — | — |
| Herz | 399 | 234 | 360 | — | — | — | — | — |
| | 740 | 411 | 610 | — | — | — | — | — |
| Lunge | 1000 | 1000 | 795 | 142 | 149 | — | — | — |
| | 1000 | 820 | 971 | 127 | 66 | — | — | — |
| Muskulatur | (818) | (1670) | (2452) | (317) | — | — | — | — |
| | 415 | 459 | 583 | 47 | — | — | — | — |
| Organanteil | 83781 | 57722 | 78498 | 22261 | 11699 | 5356 | 826 | 707 |
| Gesamtzerfall | 152540 | 182075 | 132231 | 79065 | 49637 | 86283 | 52235 | 14587 |
| Prozent d. Eingabe | 17 | 20,4 | 14,8 | 8,8 | 5,6 | 9,6 | 5,8 | 1,6 |
| Tiergewicht | 123 | 134 | 113 | 128 | 128 | 118 | 108 | 92 |
| Blutvolumen | 8,23 | 9,0 | 7,56 | 8,57 | 8,57 | 7,9 | 7,23 | 6,17 |

trastmittels in der Blase vorliegt. Die Aktivität nimmt während der ersten 3 Std stetig ab, nach 24 Std ist der gemessene Wert in der Größenordnung des Zählrohr-Nulleffekts. In Milz, Herz und Lunge ist schon nach 3 Std bei der verabreichten Isotopendosis und der verwendeten Meßmethodik keine über dem Nulleffekt liegende Aktivität nachzuweisen. Von den parenchymatösen Organen weist die Leber die höchste Zerfallszahl auf, die während der ersten 3 Std rasch abnimmt und nach 24 Std gegen Null konvergiert. Bezieht man die gemessenen Zerfallszahlen auf Gramm Gewebe, so hat die Niere, ihrer Exkretionsfunktion entsprechend, die höchste Gramm-Impulszahl, in weitem Abstand gefolgt von Leber, Fett, Milz, Magen, Dünndarm, Herz, Dickdarm und Muskulatur. Von letzterer wurde nur die Gramm-Impulszahl bestimmt, weil nicht alle Muskeln herauspräpariert werden konnten; sie liegt auffallend niedrig.

Überblickt man die Summe der Zerfallszahlen der Organe zu den verschiedenen Zeiten, so bemerkt man, daß nach 24 Std mit Ausnahme eines kleinen Restes in der Dünn- und Dickdarmwand keine markierte Substanz oder $^{131}$J-haltige Abbauprodukte mehr in den Organen nachzuweisen sind. Es wurde maximal 20,4% der Eingabe wiedergefunden, der Rest wird sich nur zu einem kleinen Teil auf die nicht untersuchten Anteile (Haut, Bindegewebe, Skelet, Teile der Muskulatur) verteilen, hauptsächlich aber mit dem Harn ausgeschieden worden sein. Die Präparation und Aufarbeitung der Schilddrüse ist wegen der Kleinheit des Organs sehr schwierig; wir haben aber bei orientierender Messung mit dem Zählrohr über der Schilddrüsengegend keine höhere Aktivität finden können als über dem übrigen Situs. Die Tiere vertrugen die Injektion des Präparates in die Schwanzvene in der verwendeten Konzentration gut.

*B. Versuche am Menschen.* Nachdem wir aus den Tierversuchen gesehen hatten, daß in den Organen keine wesentliche Speicherung stattfindet, interessierte uns bei den Versuchen am Menschen der Weg und die Geschwindigkeit der Ausscheidung. Neben der Aktivität im Harn zu verschiedenen Zeiten untersuchten wir die Konzentration im Blute mit fortlaufender Registrierung der Aktivität über dem Herzen. Es wurde auch mit geeigneter Ausblendung über der Niere gemessen, die Interpretation der hier gemessenen Aktivität ist aber schwierig und soll an anderer Stelle ausführlich dargelegt werden. Weiter bestimmten wir die Aktivität im Magen- bzw. Duodenalsaft und im Speichel, um einen weiteren Ausscheidungsweg der Substanz zu erfassen, der allerdings wieder in die bekannte Exkretion eines Teiles des Urografins im Stuhl münden würde. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt; man sieht, daß nur im Speichel eines Patienten nach 40 min eine meßbare Aktivität auftritt, im Duodenal- und Magensaft dagegen schon nach 10 min, wenn auch im Verhältnis zur verabreichten Dosis geringe Impulszahlen gemessen werden. Es

war mit Rücksicht auf die Patienten leider nicht möglich, die Aktivität in den genannten Exkreten über mehrere Stunden zu verfolgen; es ist anzunehmen, daß die Aktivität dann noch weiter ansteigt. Die in den ersten Stunden im Harn ausgeschiedene Menge markierter Substanz, ausgedrückt als in der gesamten ausgeschiedenen Harnmenge pro Minute zerfallende Teilchen (vermindert um die Ansprechwahrscheinlichkeit des Zählrohres) von 6 Patienten zeigt, daß die Ausscheidung sehr unregelmäßig vonstatten geht. Bei 4 der 6 Untersuchten sinkt die Menge ausgeschiedener markierter Substanz in der zweiten Viertelstunde stark ab,

Tabelle 2. *Zerfallszahlen im Speichel, Duodenal- und Magensaft von 3 nierengesunden Patienten.*

| Zeit n. d. Injektion | Speichel Pat. I | | Speichel Pat. II | | Speichel Pat. III | | Duodenalsaft Pat. I | | Duodenalsaft Pat. II | | Magensaft Pat. III | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Menge | | Menge | | Menge | | Menge | | Menge | | Menge | |
| 10 min | 0,3 | 0 | 1,1 | 0 | 0,6 | 0 | 6,8 | 317 | 0,4 | 48 | 7,8 | 48 |
| 20 min | 1,3 | 0 | 1,0 | 0 | 0,5 | 0 | 7,0 | 230 | 0,5 | 37 | 6,0 | 70 |
| 30 min | 0,4 | 0 | 1,2 | 0 | 0,4 | 0 | 3,8 | 174 | 1,3 | 36 | 7,2 | 62 |
| 40 min | 0,9 | 36 | 0,9 | 0 | 0,8 | 0 | 3,2 | 99 | 3,9 | 54 | 10,8 | 142 |

um in den folgenden 15 min erneut anzusteigen. Bei einer weiteren Versuchsperson ist dieser Abfall erst im dritten Versuchsabschnitt zu finden, während nur in einem Falle von der zweiten Viertelstunde ab ein kontinuierlicher Abfall zu sehen ist, wie er bei einer nur durch die Niere eliminierten Substanz zu erwarten gewesen wäre. Der während der Versuchsperiode ausgeschiedene Anteil an verabfolgter Gesamtaktivität betrug bei den sechs Patienten 54,0; 23,7; 34,7; 34,2; 46,8 und 31,4%. Bei einem weiteren Patienten fand sich im 24-Stundenharn 61%, in dem von der 24. bis zur 48. Stunde gelassenen Urin nur noch 0,5% der verabreichten Aktivität (Abb. 1).

Da die Registrierung der Aktivität des Blutes durch fortlaufende Messung über dem Herzen nur relative Werte ergibt, kann das Ergebnis nur als biologische Halbwertzeit der markierten Substanz angegeben werden. Sie betrug bei den sechs Patienten 70, 260, 364, 64, 63 und 90 min, ist also schon bei Nierengesunden sehr großen Schwankungen unterworfen.

## Diskussion.

Das wichtigste Ergebnis unserer Tierversuche ist wohl, daß sich in den meisten Organen nach 24 Std keine markierte Substanz mehr nachweisen läßt. Lediglich in der Wand des Dünn- und Dickdarmes findet sich noch Aktivität. Es ist nicht anzunehmen, daß sie aus anhaftendem Darminhalt stammt, weil der Darm sorgfältig mit 100 ml Kochsalzlösung gespült wurde und Urografin sehr gut wasserlöslich ist. Man muß viel-

mehr eine Exkretion eines größeren Teils des verabreichten Urografins durch die Darm (vielleicht auch Magen-) schleimhaut annehmen, wie sie nach unseren Versuchen mit $^{131}J$-markiertem Biligrafin auch für dieses wahrscheinlich ist. Es gibt ein dazu analoges Verhalten markierten Thyroxins, das nach parenteraler Gabe ebenfalls durch den Magen-Darmtrakt ausgeschieden wird[2]. Die Ausscheidung mit der Galle scheint nach unseren Messungen im Duodenalsaft des Menschen nicht sehr groß zu sein, auch im Magensaft findet sich zunächst nur wenig Aktivität, im

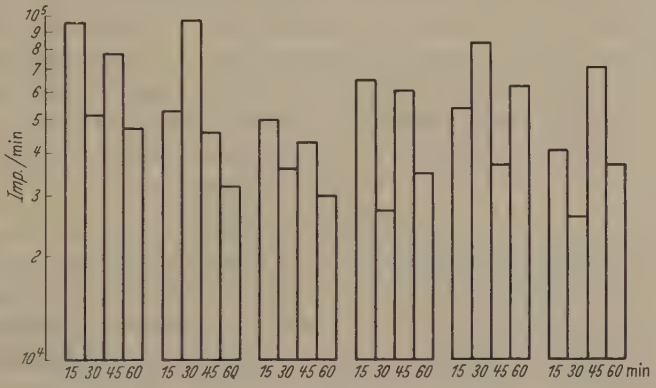



Abb. 1. Zerfallszahlen in 4 15 min-Harnportionen nach der Injektion von 96 $\mu C^{131}J$ markiertem Urografin.

Speichel nur in einem Falle. Wir vermuten aber, daß nach der ersten Stunde die Ausscheidung zunimmt. Die Erythrozytenaktivität betrug zwischen 64 und 79%, d. h., daß der größte Teil der Aktivität in den Erythrocyten vorlag, wenn nicht durch die Sedimentation oder Fixation an der Erythrocytenoberfläche ein Teil der Substanz mit den zellulären Elementen zu Boden ging. Das stimmt nicht mit den Beobachtungen von Langecker c. s.[4] überein, die nur 6 bis 16,2% beim Menschen und 3,7 bis 17% beim Hund an Erythrocyten gebunden fanden. Vielleicht erklärt sich die Diskrepanz dadurch, daß wir das Plasma erst 24 Std nach Absetzen abtrennten und die Erythrocytenmembran durchgängig geworden war. Im Harn wird in der ersten Stunde eine sehr große Menge Urografin ausgeschieden. Wir fanden deshalb bei unseren Tieren nach 45 min in den Organen nur 15 bzw. 18% der Eingabe wieder; etwa 20 bis 30% dürften auf die nicht untersuchten Teile (Rest der Muskulatur, Bindegewebe, Haut, Skelet und Nervensystem mit Gehirn) entfallen, die restlichen 50% sind mit dem Harn ausgeschieden worden, maximal 12% fanden wir nach 45 min im Darminhalt. Auch bei den Patienten fanden sich 23 bis 54% der Eingabe schon nach der ersten Stunde im Harn wieder, was mit den Angaben von Langecker, Harwart und Junkmann[4] übereinstimmt. Es verwundert,

daß in den weiteren 24 Std nur noch wenig mehr im Harn erscheint: bei einem unserer Patienten betrug die Ausscheidung in den ersten 24 Std 61%, nach weiteren 24 Std kamen nur noch 0,5% zum Vorschein. Auch bei den genannten Autoren betrug die Gesamtausscheidung in 24 Std maximal 77,1%, im Mittel 65,5%. Der Rest wird demnach im Stuhl ausgeschieden, was nach den Befunden an der Ratte wesentlich länger dauert, als die Exkretion durch die Niere. Vielleicht liegt auch die Nierenschwelle höher als die des Darmes. Die fortlaufende Registrierung der Blutaktivität ergab, daß der Blutspiegel der markierten Substanz schon beim Nierengesunden verschieden schnell abfällt. Das läßt, wie die oben aufgeführten Befunde vermuten, daß dem Urografin kein einheitlicher Ausscheidungsmechanismus zugrunde liegt. Für die diagnostische Anwendung des Präparates ist es wichtig zu wissen, daß es nach 24 Std aus fast allen Organen verschwunden und schon nach einer Stunde bis zur Hälfte durch die Niere eliminiert ist.

## Zusammenfassung.

Der Verbleib radioaktiv markierten Urografins bei Mensch und Ratte wurde an 10 Patienten und 8 Versuchstieren verfolgt:

1. In allen parenchymatösen Organen, mit Ausnahme von Dünn- und Dickdarm und im Blut, fällt die Konzentration des $^{131}$J-Urografins annähernd exponentiell und rasch ab; nach 24 Std ist in den erstgenannten Organen nach i.v. Gabe von 70 $\mu$c keine Aktivität mehr zumessen.

2. Die Zerfallszahl in Dünn- und Dickdarm nimmt langsamer ab, im Darminhalt findet sich nach 24 Std noch erhebliche Aktivität. Da im Magen- und Duodenalsaft während der ersten Stunde nur wenig markierte Substanz nachzuweisen ist, muß die Aktivität im Darmlumen vorwiegend aus der Darmsekretion stammen. Im Speichel findet sich nur bei einem der 3 Untersuchten innerhalb einer Stunde $^{131}$J-Urografin.

3. Die Hauptmenge der verabreichten Verbindung findet sich nach einer Stunde im Harn, es wurde zwischen 23 und 54% der Eingabe gemessen. Die Ausscheidung steigt dann nur noch wenig an.

4. Die Aktivitäten der in 15-minütigen Abständen über 2 Std gewonnenen Harnportionen sind, wie die Halbwertszeit der Plasmakonzentration, starken Schwankungen unterworfen. Daraus und aus den oben genannten Befunden ist auf einen nicht einheitlichen Ausscheidungsweg der Substanz zu schließen.

## Literatur.

[1] Cartland, G. F., and C. Koch: Amer. J. Physiol. **85**, 540 (1928). — [2] Johnson, P. C., and W. H. Beierwaltes: J. Labor. a. Clin. Med. **41**, 676 (1953). — [3] Kimbel, K. H., W. Börner u. E. Heise: Fortschr. Röntgenstr. **83**, 1 (1955). — [4] Langecker, H., A. Harwart u. K. Junkmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 584 (1954).

Dr. K. H. Kimbel, Erlangen, Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 269—277 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. F. Hauschild).

# Die Wirkung einiger Phenothiazinderivate*, insbesondere Megaphen, auf den Gasstoffwechsel der weißen Ratte.

Von
Karl Feller.

Mit 8 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 14. März 1955.)*

Unter den Phenothiazinderivaten findet vor allen Dingen das Megaphen seit der Einführung der „potenzierten Narkose" und der sogenannten „Hibernation arteficielle" auf zahlreichen Gebieten der Medizin Anwendung[1, 4, 9, 11, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28]. Neben der zentralen Wirkung[5, 38] wird eine Herabsetzung des Zellstoffwechsels als typisch beschrieben[6, 8, 10, 33].

Im folgenden wird über Untersuchungen mit Megaphen, Phenergan und Diparcol berichtet, die zum Ziele hatten, zu klären:

1. Welchen Einfluß Megaphen und ihm nahestehende Präparate auf den Gaswechsel der normalen weißen Ratte haben und

2. ob der durch Thyroxin und Dinitrophenol erhöhte Stoffwechsel beeinflußt wird.

## Methodik.

Die Versuche wurden in der Zeit von Juni bis September 1954 an 150 weißen Ratten beiderlei Geschlechts durchgeführt.

Zur Bestimmung des respiratorischen Stoffwechsels kam eine modifizierte Apparatur nach Hecht[18] und Junkmann[23] zur Anwendung. Sie erlaubt eine Bestimmung des verbrauchten Sauerstoffes und der gebildeten Kohlensäure in kurzen Zeitabständen.

Folgende Abänderung hat die Genauigkeit der Messungen erhöht: Zur Nachfüllung des verbrauchten Sauerstoffes wird eine 100 ml-Bürette mit Schellbach-Streifen und $^1/_5$ ml-Einteilung verwendet, die über einen Dreiwegehahn mit der Apparatur in Verbindung steht. Aus einer Flasche fließt soviel $^1/_{10}$ normale KOH in die Bürette nach, wie Sauerstoff diese verläßt. Der hierbei auftretende Fehler liegt bei einem Sauerstoffverbrauch von 100 ml unter 0,3 %. Das Kontaktmanometer konnte so eingestellt werden, daß bei einem Defizit von 1—$^1/_2$ ml Sauerstoff im

* *Chemische Bezeichnungen der Handelspräparate.*
*Megaphen* = N-(3-Dimethylamino)-propyl-3-Chlorphenothiazin;
*Phenergan* = N-(β-Dimethylamino-propyl)-phenothiazin;
*Diparcol* = N-(2′-Diäthylaminoäthyl)-phenothiazin.

System ein Kontaktschluß erfolgte. Die absorbierte Kohlensäure wurde nach der Methode von WINKLER[30] bestimmt.

Das Gewicht der Tiere betrug 100—110 g. Sie erhielten stets zur gleichen Tageszeit eine Standardkost nach OBERDISSÉ[32], Wasser wurde ad libitum verabreicht. Die Versuche wurden in nüchternem Zustand jeweils 24 Std nach der letzten Nahrungsaufnahme vorgenommen. Die Temperatur im Stall schwankte zwischen 20 und 22° C. 4 Std vor Versuchsbeginn kamen die Tiere in den Versuchsraum, der eine Lufttemperatur von 24—25° C hatte und anschließend in den Tierbehälter. Dieser besteht aus einem Glaszylinder von 7 cm Durchmesser und 20 cm Länge, in dem das

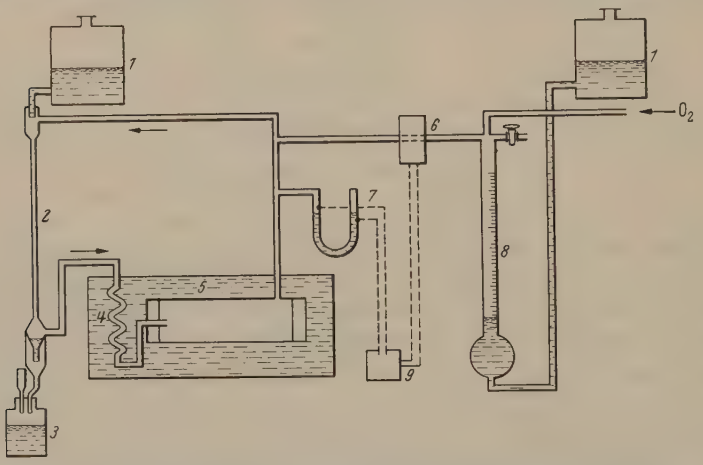



Abb. 1. Stoffwechselapparatur. *1* Flasche mit $^1/_{10}$ n KOH. *2* Luftpumpe. *3* Auffangflasche für KOH. *4* Vorwärmeschlange für $O_2$. *5* Tierbehälter. *6* Relais zum $O_2$-Zufuhrverschluß. *7* Kontaktmanometer. *8* Bürette mit SCHELLBACH-Streifen. *9* Schaltrelais.

Tier auf einem Rost sitzt. Dieser Behälter ist in den Sauerstoffkreislauf der Apparatur eingeschaltet und befindet sich in einem Wasserthermostaten, der mittels Kontaktthermometer und Rührer auf einer Temperatur von 26° ± 0,2 gehalten wird.

Bei unseren Versuchen gingen wir vom sogenannten Minimalumsatz aus, d. h. dem tiefsten Wert, der unter Grundumsatzbedingungen ohne jede sonstige Einwirkung gemessen werden kann. Um diesen Wert zumindest annähernd zu erhalten, wurde — nachdem das Tier sich wenigstens für 1 Std an die Apparatur gewöhnen konnte — der Sauerstoffverbrauch in den anschließenden 60 min bestimmt.

Die Aktivität der Tiere in der Meßperiode mußte genauestens beobachtet werden, denn nach MITSHELL u. CARMAN[31] kann in kurzen Meßperioden durch die Aktivität der Tiere eine Umsatzsteigerung von 60—70% erfolgen. DAVIS u. HASTINGS[7] unterscheiden drei Aktivitätszustände: Wachsein, Dösen (dozing), Schlafen. Beim Dösen kann schon ein um 15% vermehrter Sauerstoffverbrauch gegenüber dem Schlafen festgestellt werden.

Wir nahmen die Bestimmungen an den Tieren möglichst im Stadium des Dösens oder Schlafens vor. Mit jedem Tier wurden mindestens 10 Messungen an verschiedenen Tagen ausgeführt. Von 150 Ratten schieden 54 aus, da sie sich nicht an die Apparatur gewöhnten und häufig Aktivitätsperioden während der Bestimmung

zeigten. Trotz dieser Auslese betrug die individuelle Schwankungsbreite etwa $\pm$ 15%. Die Minimalwerte lagen bei den von uns verwendeten Ratten im Gewicht von 100—110 g zwischen 95—120 ml/Std/100 g. Die Tiere erhielten das zu untersuchende Präparat in Mengen von maximal 0,5 ml subcutan. Nur Dinitrophenol wurde intraperitoneal injiziert. Die Meßperiode (im eigentlichen Versuch) dauerte 30 min. Anschließend wurde die Körpertemperatur mittels eines etwa 4 cm tief rectal eingeführten Quecksilberthermometers mit Einteilung in $^1/_{10}^\circ$ und einer Einstellzeit von 15 sec gemessen. Die nächste Messung erfolgte 60 min später.

## Versuchsteil.

Wirkung von *Megaphen*, *Phenergan* und *Diparcol* allein.

Je 8 Tiere erhielten in einer Dosierung von 1 mg/kg subcutan *Megaphen*, *Phenergan* und *Diparcol*. Alle reagierten mit einer Stoffwechselsteigerung, die am stärksten in der 1. Std war und durchschnittlich 20% betrug. Nach 4—5 Std war die Wirkung fast vollständig abgeklungen. Die Rectaltemperatur der Diparcol-, Phenergan- und Megaphentiere blieb im Bereich der Norm (37,5° C $\pm$ 0,3).

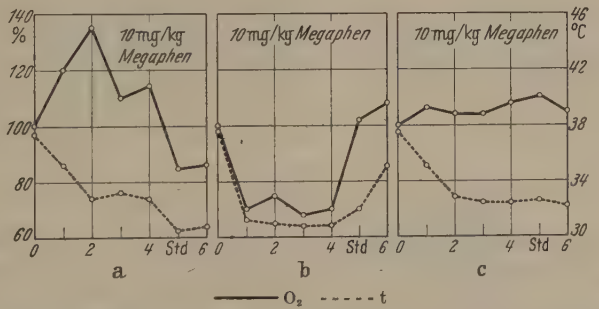



Abb. 2. Verschiedenes Verhalten von 3 Ratten nach 10 mg/kg Megaphen. *a* Körpertemperatur über 32°: Tier reagiert mit einer Gasstoffwechselsteigerung. *b* Rectaltemperatur unter 32°: Sauerstoffverbrauch unter dem Minimalumsatz. *c* Körpertemperatur um 32°; $O_2$-Verbrauch in Höhe des Minimalumsatzes. 100% $O_2$ = Minimalumsatz.

Nach einer Dosierung von *10 mg/kg subcutan Diparcol* änderte sich die Rectaltemperatur der 8 Tiere nicht, während der Gasstoffwechsel in der 1. Std um 30% stieg. Eine Gasstoffwechselsteigerung von 40% wurde an 8 Tieren beobachtet, die mit *10 mg/kg Phenergan* subcutan behandelt wurden. Die Rectaltemperatur wurde um durchschnittlich 2° C erniedrigt.

16 Ratten bekamen *10 mg/kg Megaphen* subcutan injiziert; sie zeigten in der 1. Std folgenden Befund: Die Rectaltemperatur sank auf Werte zwischen 35—30° C ab. Während eine Gasstoffwechselsteigerung bei 9 Tieren bis zu maximal 50% erfolgte, reagierten 3 Tiere mit einem sofortigen Abfall unter den Minimalumsatz; 4 Tiere blieben mit ihrem Gaswechsel in Höhe des Minimalumsatzes.

Sauerstoffverbrauch und Rectaltemperatur von 3 typisch reagierenden Tieren zeigt Abb. 2. Bei der Betrachtung dieser Kurve fällt eine interessante Beziehung auf: Tiere, die eine Körpertemperatur über 32° C

hatten, zeigten auch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch. Bei solchen mit einer Temperatur von 31—32° C lag der Sauerstoffwert in Höhe des Minimalumsatzes. Ratten mit einer Rectaltemperatur unter 31° C wiesen immer einen Sauerstoffverbrauch unter dem Minimalumsatz auf. Die Beziehungen Sauerstoffverbrauch—Körpertemperatur sind in Abb. 3 mit Hilfe von zwei Regressionsgeraden graphisch dargestellt.

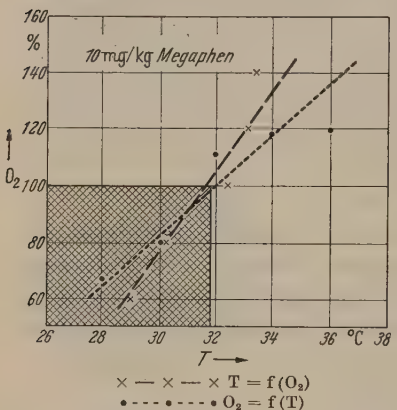



Abb. 3. Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Körpertemperatur. 100% $O_2$ = Minimalumsatz. Dieser wird bei einer Temperatur zwischen 32—31° erreicht.

*2,4-Dinitrophenol.* Verabreicht man Dinitrophenol 20 mg/kg intra-peritoneal, so erfolgt eine Stoffwechselsteigerung um durchschnittlich 20% in der 1. Std (8 Tiere). Gleichzeitig mit Dinitrophenol injiziertes Megaphen (10 mg/kg subcutan) kann die auftretende Stoffwechselsteigerung nicht verhindern. Die Stoffwechselsteigerung war sogar noch stärker als nach Dinitrophenol allein (Abb. 4.)

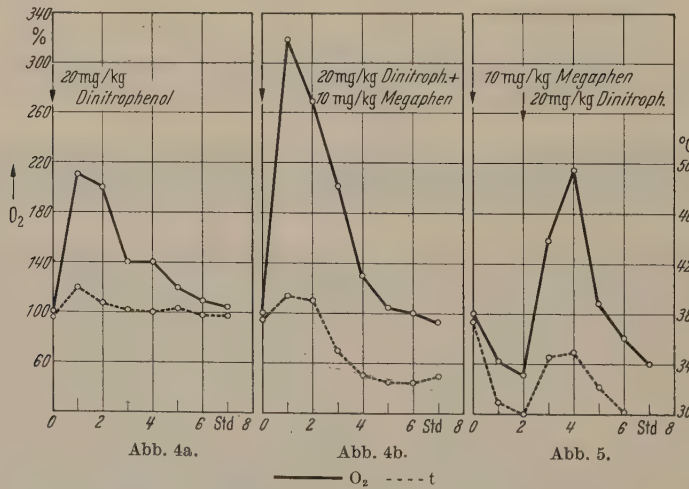



Abb. 4a. Abb. 4b. Abb. 5.

Abb. 4a. $O_2$-Verbrauch der Ratte nach 20 mg/kg Dinitrophenol intraperitoneal.
Abb. 4b. 20 mg/kg Dinitrophenol intraperitoneal + 10 mg/kg Megaphen subcutan.
Abb. 5. Megaphen 10 mg/kg subcutan. Die Körpertemperatur sinkt unter 32°. Sauerstoffverbrauch unter den Minimalumsatz. Dinitrophenol läßt Temperatur und $O_2$-Verbrauch ansteigen.

Selbst wenn durch Megaphen der Sauerstoffverbrauch bei einer Temperatur von 31—32° C den Minimalumsatz erreicht hat, steigert Dinitrophenol den Gaswechsel und läßt die Temperatur um 5° ansteigen

(Abb. 5). Nach Abklingen der Dinitrophenolwirkung sinken Temperatur und Sauerstoffverbrauch wieder.

Die Abb. 6 zeigt die Abhängigkeit Sauerstoffverbrauch—Rectaltemperatur.

*Thyroxin.* Weiterhin wurde die Megaphenwirkung auf 16 Tiere untersucht, die an den drei vorangegangenen Tagen je 2 mg/kg Thyroxin subcutan erhalten hatten. Die Thyroxinverabreichung allein bewirkte eine Stoffwechselsteigerung zwischen 50—70%. Die Rectaltemperatur schwankte zwischen 37,5 und 37,8° C. Wurde diesen Tieren nun 10 mg/kg Megaphen subcutan verabreicht, so kam es zunächst in der 1. Std nach der Injektion zu einer mäßigen zusätzlichen Stoffwechselsteigerung, während die Körpertemperatur um 3° C abfiel. Die Rectaltemperatur sank jedoch weiter und mit ihr gleichzeitig auch der Sauerstoffverbrauch, um bei etwa 31—32° C den Minimalumsatz zu erreichen. Bei den 16 Versuchstieren konnte Megaphen nur in einem Falle den Sauerstoffverbrauch nicht unter den Minimalumsatz senken. Hier lag aber auch die Körpertemperatur über 32° C. Klang die Wirkung des Megaphens ab, so stieg die Körpertemperatur langsam und mit ihr auch der Sauerstoffverbrauch. Nachdem die Megaphenwirkung völlig abgeklungen war (nach etwa 12 Std), konnte sich der Thyroxineffekt wieder durchsetzen (Abb. 8).

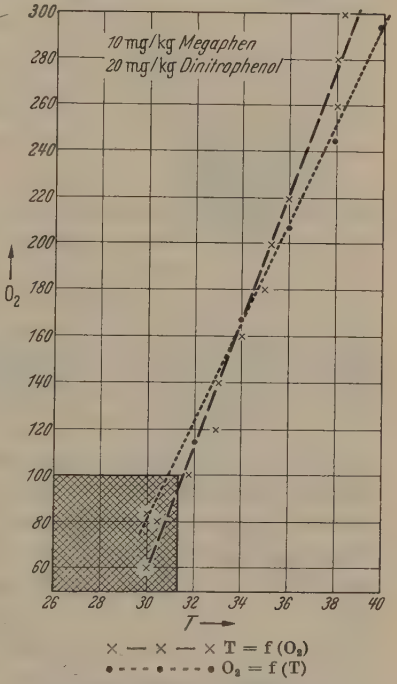



Abb. 6. Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Körpertemperatur. 100% $O_2$-Verbrauch = Minimalumsatz. Dieser Wert wird bei einer Temperatur zwischen 32—31° erreicht.

Bei keinem der mit Megaphen behandelten Tiere war eine Spontanaktivität zu erkennen. Der Sauerstoffverbrauch und die dazugehörige Rectaltemperatur der drei Megaphenversuchsreihen wurden in ein Sauerstoffverbrauch-Temperatur-Diagramm eingetragen. Es zeigte sich eine verhältnismäßig strenge Abhängigkeit von Sauerstoffverbrauch und Temperatur.

Die rechnerische Überprüfung konnte diese Abhängigkeit bestätigen, und es ergab sich mit Hilfe der Korrelationsrechung[15] ein Korrelations-

koeffizient, der für alle drei Versuchsreihen über + 0,5 lag. Bei graphischer Darstellung ließ sich mit Hilfe der Regressionsgeraden eine Rückkehr zum ermittelten Minimalumsatz zwischen 31 und 32° erkennen (Abb. 3, 6 u. 7).

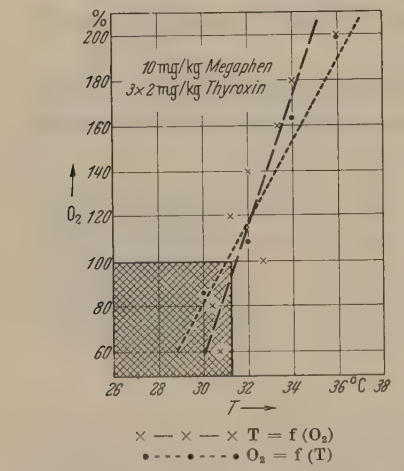



Abb. 7. Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Körpertemperatur. 100% $O_2$-Verbrauch = Minimalumsatz. Dieser Wert wird bei einer Temperatur zwischen 31 und 32° erreicht.

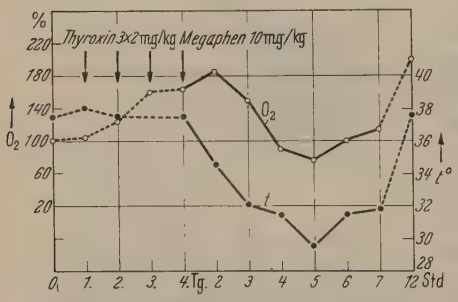



Abb. 8. 2 mg/kg subcutan Thyroxin an drei aufeinanderfolgenden Tagen gegeben. Am 4. Tag 10 mg/kg subcutan Megaphen.

Der respiratorische Quotient veränderte sich nicht und blieb während der Versuche im Bereich der physiologischen Schwankungsbreite (0,74 ± 0,03).

## Diskussion der Versuchsergebnisse.

Verschiedene Autoren berichteten von einer Hemmung des Zellstoffwechsels in vitro nach Gaben verschiedener Phenothiazin-Abkömmlinge. So erhielt COURVOISIER[6] an Gehirnschnitten von Meerschweinchen durch Megaphen in einer Konzentration von 1:5700 eine 21%ige Hemmung, durch 1:2800 eine 43,5%ige und durch 1:1400 eine 62,5%ige Hemmung der Zellatmung. DRIESSENS[10] stellte an Gewebskulturen eine völlige Wachstumshemmung durch Phenergan in einer Konzentration von 1:2000 fest. 1:10000 war wirkungslos. DECOURT[8] konnte an Infusorien mit Megaphen in einer Konzentration von 1:400000 sowie mit 1:200000 Phenergan eine Hemmung erhalten. Über eine Beeinflussung des Zellstoffwechsels der Wurzelspitzenzellen von Vicia faba equina durch Megaphen in der Konzentration von 1:50000 berichteten PETERS u. LEHR[34]. Teilweise zeigten sich hierbei schon irreversible Schädigungen.

An Kaulquappen konnten wir in einer Konzentration von 1:10000000 nach sechs Wochen keine Beeinflussung der Metamorphose feststellen. In der Verdünnung 1:1000000 starben die Tiere schon nach zwei bis drei Tagen[36].

Diese Hemmung des Zellstoffwechsels kann ein „histotoxischer" Effekt sein, da teilweise sehr hohe Konzentrationen verwendet wurden. GROSSE-BROCKHOFF[14] sah nach Verabreichung von 50—200 mg Megaphen beim Menschen keine Senkung des Grundumsatzes unter den Minimalumsatz.

In unseren Versuchen an Ratten ist nach 1 und 10 mg/kg Diparcol und Phenergan eine Erhöhung des Gaswechsels nachweisbar, nie aber eine Senkung. Zum Teil dürfte es sich hierbei um eine zentrale Erregung (HAAS) handeln, denn nach 10 mg/kg werden die Tiere unruhig. Diese

Befunde entsprechen in bezug auf die Stoffwechselerhöhung den Ergebnissen von Benstz[3].

Unter Megaphen 1 mg/kg verhalten sich die Tiere absolut ruhig. In dieser Dosierung steigert es den Gaswechsel, während sich die Körpertemperatur nicht merklich verändert. 10 mg/kg Megaphen erhöhen trotz Absinken der Rectaltemperatur den Gasstoffwechsel, jedoch nur, solange die Körpertemperatur über 32° C liegt. Bei 31—32° C wird jedoch der Minimalumsatz erreicht. Tiere mit einer Körpertemperatur unter 31° C hatten auch immer einen Gaswechsel unter dem Minimalumsatz.

Werden Ratten ohne Medikation durch Abkühlung auf diese tiefen Temperaturen gebracht, so kehrt der anfangs stark erhöhte Stoffwechsel erst bei einer Rectaltemperatur von 26—28° C zum Minimalumsatz zurück.

In unseren Versuchen war eine eventuell zu erwartende Herabsetzung des Gasstoffwechsels durch die Phenothiazinkörper bei einer im physiologischen Bereich bleibenden Rectaltemperatur (37,5° C $\pm$ 0,3) nicht zu erkennen. Es kam im Gegenteil zu einer Stoffwechselsteigerung. Selbst Megaphengaben, welche die Rectaltemperatur um 4° C senkten, führten zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch. Hierfür scheint folgende Erklärung naheliegend. Zunächst wird beim Einsetzen der Megaphenwirkung durch periphere Gefäßerweiterung die Wärmeabgabe vermehrt. Diesen Wärmeverlust versucht das Tier durch Erhöhung des Stoffwechsels auszugleichen. Die Gegenregulation ist aber nicht ausreichend, um, wie beim unbehandelten Tier mit entsprechender Körpertemperatur, zu einer Normalisierung der Rectaltemperatur zu führen oder ein weiteres Absinken zu verhindern. Diese teilweise Hemmung der Gegenregulation könnte durch die starke zentralsedative Komponente des Megaphens bedingt sein. Nach Courvoisier[6] wird durch Megaphen das Atemvolumen erhöht. Dies könnte als Erklärung für die Stoffwechselerhöhung ausreichen, zumal Kleintiere bis zu 70% ihres vermehrten Bedarfes an Wärmeenergie durch Tätigkeit der Atemmuskulatur decken[2].

Von Dinitrophenol ist eine starke Intensivierung des Zellstoffwechsels bekannt[37]. Durch gleichzeitige Gaben von Megaphen konnte dieser erhöhte Zellstoffwechsel nicht unterdrückt werden. Es konnte sogar in den ersten 2 Std eine zusätzliche Stoffwechselsteigerung festgestellt werden. Erst nach Abklingen der Wirkung des Dinitrophenols setzte sich die des Megaphens langsam durch. Dinitrophenol war auch dann noch wirksam, wenn nach vorheriger Gabe von Megaphen die Rectaltemperatur unter 31° C gesunken war. Megaphen vermag also die Stoffwechselsteigerung nach Dinitrophenol nicht zu unterdrücken.

Der gesteigerte Sauerstoffverbrauch nach Verabreichung von *Thyroxin*[13] wird durch Megaphen zunächst noch verstärkt, obwohl die Rectaltemperatur bereits um 3° C abgefallen ist. In diesem Temperaturbereich reagieren also auch diejenigen Ratten nach Megaphen mit einer

Stoffwechselsteigerung, deren Sauerstoffverbrauch durch Thyroxingaben erhöht wurde. Weiteres Absinken der Körpertemperatur läßt jetzt auch den Sauerstoffverbrauch abnehmen, so daß bei 31—32° C der Minimalumsatz erreicht wird. Klingt die Megaphenwirkung ab, so tritt die Thyroxin-Stoffwechselsteigerung bei Rectaltemperaturen über 32 C° wieder in Erscheinung. Die Reduktion der Thyroxinwirkung ist vor allem durch die tiefe Temperatur und eine gleichzeitige zentrale Beeinflussung bedingt, da der Minimalumsatz auch hier zwischen 31 und 32° C erreicht wird. LOESER u. Mitarb.[29] konnten nach 20 mg/kg Megaphen per os keine Beeinflussung der thyroxinbedingten Stoffwechselsteigerung feststellen. Da eine gleichzeitige Temperaturkontrolle nicht durchgeführt wurde, ist es möglich, daß mit dieser Dosierung nicht die tiefe Körpertemperatur erreicht wird, die zu einer Beeinflussung der Thyroxin-Stoffwechselsteigerung nötig ist.

## Zusammenfassung.

Mit einer modifizierten HECHT-JUNKMANNschen Apparatur wurde der Minimalumsatz von weißen Ratten bestimmt.

1. Die Phenothiazinderivate Phenergan, Diparcol und Megaphen führten in einer Dosierung von 1 mg/kg subcutan zu einer Stoffwechselsteigerung; ebenso wirkten 10 mg/kg Phenergan und Diparcol und auch 10 mg/kg Megaphen. In einigen Fällen blieb der Stoffwechsel nach Megaphen in Höhe des Minimalumsatzes oder wurde gesenkt. Es konnte gezeigt werden, daß dieses verschiedene Verhalten von der jeweiligen Höhe der Körpertemperatur abhängig ist.

2. Die Erhöhung des Sauerstoffverbrauches durch Dinitrophenol wurde durch Megaphen nicht beeinflußt. Der durch Thyroxin erhöhte Stoffwechsel wurde erst dann durch Megaphen gesenkt, wenn die Rectaltemperatur unter 31—32° C lag.

3. Die vorliegenden Untersuchungen sprechen nicht für eine periphere Hemmung des Zellstoffwechsels durch Megaphen.

## Literatur.

[1] ARNOLD, O. H., ST. HIFT u. W. SOLMS: Wien. med. Wschr. **1953**, 563. — [2] BÄNDER, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 365 (1954). — [3] BENSTZ, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 575 (1954). — [4] BROGLIE, M., G. JÖRGENSEN u. G. VOSS: Ärztl. Wschr. **1954**, 697—700. — [5] CHAUCHARD, B., et P. CHAUCHARD: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1869 (1952). — [6] COURVOISIER, S., J. FOURNEL, R. DUCROT, M. KOLSKY et P. KOETSCHET: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — [7] DAVIS, J. E., and A. B. HASTINGS: Amer. J. Physiol. **109**, 683 (1934). — [8] DECOURT, PH.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **236**, 1195 (1953). — [9] DOGLIOTTO, A. M., u. E. CIACOTTO: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 707. — [10] DRIESSENS, J.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1186 (1952) .— [11] FLÜGEL, H.: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 20. Tg. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 68 (1952). — [12] GÄNSHIRT, H., u. BRILMAYER: Vortr. Kongr. d. dtsch. Neurol. u. Psych., München 1953. — [13] GRAB, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 16 (1952). — [14] GROSSE-BROCKHOFF, F.:

Verh. dtsch. pharmak. Ges., 20. Tg. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 63 (1953). — [15] Günther, H.: Die Variabilität der Organismen und ihre Normgrenzen. Leipzig: Georg Thieme 1935. — [16] Haas, H.: Histamine und Antihistamine. Aulendorf 1951. — [17] Haas, H.: Histamine und Antihistamine. II. Aulendorf 1952. — [18] Hecht, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **166**, 432 (1932). — [19] Hoffmann, Th.: Med. Klin. **1953**, 1677. — [20] Huegenard, P.: Anaesthesist (Berlin) **1**, 33 (1953). — [21] Irmer, W., u. E. H. Koss: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 361. — [22] Jentzer, A.: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 1215. — [23] Junkmann, K.: Z. exper. Med. **97**, 156 (1935). — [24] Laborit, H.: Presse méd. **1952**, 140. — [25] Laborit, H.: Presse méd. **1952**, 206. — [26] Laborit, H.: Méd. et Hyg. **218**, 189 (1952). — [27] Laborit, H.: Bruxelle-Med. **33**, 863 (1951). — [28] Laborit, H.: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 20. Tg. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41 (1953). — [29] Loeser, A., H. Filk, K. Ritter u. E. Stürmer: Klin. Wschr. **1954**, 265. — [30] Medicus, L.: Maßanalyse. Dresden und Leipzig: Theodor Steinkopff 1947. — [31] Mitchell, H. H., and G. G. Carman: Amer. J. Physiol. **76**, 388 (1926). — [32] Oberdissé, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 150 (1931). — [33] Peruzzo, L., et R. B. Forni: Presse méd. **61**, 1463 (1953). — [34] Peters, K., u. H. Lehr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 365 (1954). — [35] Ratschow, M.: Medizinische (Stuttgart) **42**, 1351 (1953). — [36] Schneidereit, A.: Dissertation Leipzig (im Druck). — [37] Siedek, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 281 (1950). — [38] Winter, A. Ch., and L. Flataker: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 156 (1951)

Dr. Karl Feller, Pharmakologisches Institut der Universität, Leipzig C 1, Härtelstr. 16/18.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 278—300 (1955).

Aus dem William G. Kerckhoff-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Bad Nauheim (Direktor: Prof. Dr. R. Thauer) und dem Physiologischen Institut der Medizinischen Akademie, Gießen (Direktor: Prof. Dr. R. Thauer).

# Kreislauf, respiratorischer Stoffwechsel und Atmung in Äthernarkose.

Von

C. Albers, W. Brendel und W. Usinger.

Mit 9 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 27. April 1955.)*

Die Narkose stellt als gleichsam unblutiger und reversibler Eingriff am Zentralnervensystem eine fruchtbare Methode dar, um tiefere Einblicke in die physiologischen Regulationen von Kreislauf, respiratorischem Stoffwechsel und Atmung zu gewinnen. Unter diesem Gesichtspunkt, also im wesentlichen aus der Sicht des Physiologen, haben wir bereits in früheren Arbeiten [7, 9, 10, 22, 23, 35] zu klären versucht, welche Einflüsse die Barbiturate und die Chloralose ausüben. Dabei hatte sich gezeigt, daß die beim pharmakologisch unbeeinflußten Hund bestehenden Korrelationen zwischen Sauerstoffverbrauch und Herzminutenvolumen einerseits und zwischen Sauerstoffverbrauch und Atemminutenvolumen andererseits auch in Narkose im allgemeinen erhalten bleiben. Jedoch fanden sich charakteristische Unterschiede in der Art und Weise, wie diese Korrelationen durch das Zusammenspiel der daran beteiligten Einzelfaktoren zustandekommen: So wird z. B. das Herzminutenvolumen im Wachzustand vorwiegend durch Veränderung des Schlagvolumens, in Narkose vorwiegend durch Veränderung der Herzfrequenz einreguliert. Das Erhaltenbleiben der Korrelationen hat den Gedanken nahegelegt, in der Narkosewirkung auf den Kreislauf ausschließlich eine unspezifische Anpassung an den narkotisch gedämpften Stoffwechsel zu sehen. Wäre dies der Fall, so bliebe die verschiedenartige Einregulierung des Herzminutenvolumens im Wachzustand und in Narkose unverständlich. Man muß deshalb annehmen, daß die Narkose auf einzelne Teile der Regulationsapparate einen spezifischen Einfluß ausübt, wobei zunächst die Frage offenbleibt, wie weit es sich um primäre, unmittelbare Wirkungen des Narkoticum oder um sekundäre, mittelbare Folgen solcher Primärwirkungen handelt. Für die Barbituratnarkose konnte gezeigt werden, daß eine unmittelbare Wirkung auf die reflektorische Selbststeuerung des Kreislaufs im Sinne einer

Entzügelung angenommen werden muß, und daß darüber hinaus mittelbare Folgen der durch die Atemdepression bedingten Hypoxämie wirksam sind [22, 23]. Diese Ergebnisse legten die Frage nahe, ob die für die Pernocton- und Evipannarkose gefundenen Gesetzmäßigkeiten der Kreislaufumstellung eine Besonderheit der Barbitursäure oder Ausdruck einer allgemeingültigen Wirkung der Narkose an sich sind. Die in den früheren Arbeiten durchgeführten Untersuchungen wurden deshalb mit der vorliegenden Versuchsreihe auf den Diäthyläther ausgedehnt.

## Methodik.

Die Versuche fanden in der Zeit von März 1954 bis Februar 1955 an 6 Hunden mit doppelseitigen Carotisschlingen von 15,5—26,8 kg statt (120 Ruhe- und 94 Narkoseversuche).

*1. Messung der Kreislaufgrößen.* a) Blutdruck und Carotispuls wurden fortlaufend mit dem von SCHROEDER[33] angegebenen Pelottenverfahren (siehe auch BRENDEL und KOPPERMANN[8]), der Femoralispuls mit einer Pulspelotte nach SCHROEDER[34] registriert.

b) Folgende Kreislaufgrößen wurden aus den registrierten Kurven entnommen bzw. nach WEZLER und BÖGER[37] errechnet:

1. Der systolische und diastolische Druck: $p_s$ und $p_d$ in mmHg;
2. Die Pulsfrequenz: HFr/min;
3. Die Grundschwingung des Femoralispulses: $T_{Fem}$ in msec;
4. Die Pulswellengeschwindigkeit: $a$ in m/sec;
5. Das Schlagvolumen: $V_s$ in cm³;
6. Das Minutenvolumen: $V_m$ in l/min;
7. Der elastische Gesamtwiderstand des arteriellen Systems: $E'$ in dyn/cm⁵;
8. Der periphere Gesamtwiderstand: $W$ in dyn · sec/cm⁵;
9. Der Dämpfungsfaktor des arteriellen Systems: $E'/W$.

Der Aortenquerschnitt $Q$ wurde in Anlehnung an frühere, postmortale Messungen an Hunden mit durchschnittlich 3,0 cm² eingesetzt. Da ein Teil der Versuchstiere noch lebt und absolute Werte für die vorliegende Fragestellung nicht entscheidend sind, wurde auf eine nachträgliche, direkte Messung verzichtet.

*2. Prüfung der Kreislaufreaktivität.* Zur Beurteilung der Kreislaufreaktivität wurden folgende Testreaktionen durchgeführt:

a) Der Carotissinusentlastungsreflex durch einseitiges Abklemmen einer Carotisschlinge mit einer plötzlich unter hohem Druck aufblasbaren Gummimanschette. Dauer der Abklemmung 30 sec.

b) Die Reaktion auf Adrenalin durch schnelle Injektion von 0,1 $\gamma$/kg in eine Vorderlaufvene.

c) Die Reaktion auf Kohlensäure durch Verabreichung eines Gemisches von 4 bzw. 8% Kohlensäure in Luft.

d) Die Reaktion auf 100% Sauerstoff.

Die Gasgemische zu c) und d) wurden den Tieren aus einem DOUGLAS-Sack über den Trachealtubus zugeführt.

*3. Bestimmung des respiratorischen Stoffwechsels.* Zur Bestimmung des respiratorischen Stoffwechsels wurde das Prinzip des offenen Systems angewandt: Messung des inspiratorischen Atemvolumens mit Gasuhr, Sammlung der Exspirationsluft im DOUGLAS-Sack während einer Periode von 5—10 min und Analyse mit dem HALDANE-Apparat. Zur Unterhaltung der Narkose wurde der Äther zwischen Gas-

uhr und Trachealtubus über ein elektrisch beheiztes T-Stück tropfenweise zugegeben, ohne daß Nebenluft in das System eindringen konnte.

Vor der Analyse der Ausatmungsluft mußte der Ätherdampf quantitativ wieder entfernt werden. Hierzu wurden zwei mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte, eisgekühlte Gaswaschflaschen mit feinporigen Schott-Fritten hintereinandergeschaltet und mit der Sackluft durchströmt. Die Durchströmungsgeschwindigkeit wurde mit zwei Membranpumpen und einem Rotameter auf 2 l/min eingestellt. Mit dieser Anordnung war es möglich, den Äther vollständig zu absorbieren.

Neben der Absorption spielen sich hierbei mit merklicher Wärmebildung einhergehende, oxydative Prozesse ab, bei denen ein Teil des Sauerstoffs der Sackluft verbraucht und Kohlensäure abgegeben wird, wie es ähnlich von Kärber[17] beschrieben worden ist.

Diese Verhältnisse wurden von uns in Modellversuchen untersucht: Exspirationsluft aus Ruheversuchen wurde in Douglas-Säcken gesammelt und durch die Absorptionskette geleitet, wobei zwischen Sack und Absorptionskette eine äthergefüllte Gaswaschflasche eingeschaltet war. Am Ende der Absorptionskette wurde in bestimmten Zeitabständen eine Gasprobe entnommen und im Haldane-Apparat analysiert (siehe Tab. 1). Als Kontrollen dienten die Analysenwerte der unmittelbar hinter dem Sack abgenommenen, ätherfreien Sackluft. Wie aus Tab. 1 ersichtlich,

Tabelle 1. *Absorption von Äther durch konzentrierte Schwefelsäure. Gaszusammensetzung der Durchströmungsluft in Vol-% als Funktion der Zeit.*

| Zeit | $CO_2$ | $O_2$ | $CO_2$ | $O_2$ | $CO_2$ | $O_2$ | $CO_2$ | $O_2$ | $CO_2$ | $O_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kontrolle | 4,96<br>4,97 | 15,82<br>15,82 | 1,88<br>1,89 | 18,97<br>18,98 | 3,58<br>3,58 | 17,08<br>17,09 | 4,21<br>4,21 | 15,99<br>15,98 | 1,15<br>1,17 | 19,24<br>19,25 |
| nach 2 min | 5,17 | 15,28 | 2,12 | 18,61 | 4,15 | 16,54 | — | — | — | — |
| nach 15 min | 5,00 | 15,79 | 1,93 | 18,70 | 3,86 | 16,73 | — | — | — | — |
| nach 20 min | 4,97 | 15,83 | 1,88 | 18,98 | 3,58 | 17,09 | 4,22 | 15,99 | 1,15 | 19,23 |
| nach 30 min | 4,96 | 15,82 | 1,89 | 18,97 | 3,58 | 17,09 | 4,21 | 15,98 | 1,15 | 19,24 |

sind 2 min nach Versuchsbeginn die Sauerstoffwerte der Versuchsluft deutlich gegenüber der Kontrolle erniedrigt, die Kohlensäurewerte deutlich erhöht. Zunehmend mit der Durchströmungszeit nähert sich die Zusammensetzung der Versuchsluft immer mehr derjenigen der Kontrollen, erreicht diese bei der angegebenen Durchströmungsgeschwindigkeit und bei Kühlung mit Eiswasser nach etwa 20 min und bleibt dann konstant. Dies läßt darauf schließen, daß die oxydativen Prozesse reversibler Natur sind und einem Gleichgewicht zustreben. Welcher Art diese Prozesse sind, konnten wir nicht in Erfahrung bringen. 30 min nach Versuchsbeginn fanden sich keine nennenswerten Unterschiede in der Zusammensetzung von Durchströmungsluft und Kontrolle: Die mittlere Differenz aus 15 Einzelversuchen betrug für die Kohlensäure $+ 0{,}0007 \pm 0{,}0015$ Vol-% und für den Sauerstoff $- 0{,}0066 \pm 0{,}0095$ Vol-%. Aus diesem Grunde wurden die Gasproben für die Analyse der Exspirationsluft 30 min nach Absorptionsbeginn abgenommen.

Da die Zumischung des Äthers zur Atemluft erst hinter der Gasuhr und die Analyse der Ausatmungsluft wiederum erst nach vollständiger Absorption des ausgeatmeten Äthers erfolgte, konnte der respiratorische Stoffwechsel somit nach

dem bekannten Prinzip unabhängig von Ätheraufnahme und -abgabe berechnet werden.

Auf diese Weise wurden folgende Größen erhalten:

a) Das Atemminutenvolumen: AMV in l/min, reduziert auf 0° C, 760 mm Hg und Trockenheit;
b) Die Atemfrequenz: AFr/min;
c) Der Sauerstoffverbrauch: in $cm^3$/min;
d) Die Kohlensäureausscheidung: in $cm^3$/min;
e) Der respiratorische Quotient der Exspirationsluft: *RQ*.

*4. Prüfung der somatischen Reflexe.* Zur Abschätzung der Narkosetiefe wurde eine Reihe von somatischen Reflexen in regelmäßigen Zeitabständen geprüft. In Anlehnung an die Reflexprüfung bei früheren Untersuchungen[23] wurden vorwiegend Fremdreflexe geprüft, und zwar durch Schmerzreize auslösbare Schutzreflexe und Reflexe, deren afferente Bahnen über die Hirnnerven laufen (siehe Tab. 2). Außerdem wurden Pupillenweite und Stellung der Nickhaut beobachtet.

*5. Versuchsverlauf.* Vor Beginn der Ätherversuche wurden die Tiere aus dem beheizten Stall (17° C) in nüchternem Zustand in den Versuchsraum (20—24° C) gebracht. Sie waren in einer längeren Vorperiode daran gewöhnt worden, in ruhiger Seitenlage auf dem Versuchstisch liegen zu bleiben. Bei den Ätherversuchen war es allerdings nicht immer möglich, die Tiere so zu beruhigen, daß die vor Narkosebeginn durchgeführten Ruhebestimmungen des respiratorischen Stoffwechsels und des Kreislaufs (s. u.) optimale Werte ergaben, da die Tiere durch die ungewohnte Narkoseapparatur und den geringen Äthergeruch erregter als sonst erschienen.

Die Narkose wurde *ohne jegliche Vormedikation* mit einer der Hundeschnauze angepaßten Narkosemaske eingeleitet, die einen stark mit Äther getränkten Mullappen enthielt. Nach Erreichen eines ausreichend tiefen Narkosestadiums (völlige Erschlaffung der Extremitäten) wurde intubiert und das Atemventil mit den Atemschläuchen angeschlossen. Die Unterhaltung der Narkose erfolgte über das beschriebene T-Stück, wobei die Narkosetiefe durch die Tropfgeschwindigkeit des Äthers reguliert werden konnte. Unmittelbar nach der Intubation wurden die Messungen des respiratorischen Stoffwechsels, die Kreislaufregistrierungen und die Reflexprüfungen vorgenommen. Die Messung des respiratorischen Stoffwechsels erfolgte aus methodischen Gründen in Zeitabständen von etwa 30 min. Vor und nach einer solchen Messung wurden die physikalischen Kreislaufgrößen bestimmt und in wechselnden Abständen die Prüfung des Reflexstatus bzw. der Kreislaufreaktivität vorgenommen. Die Dauer der Narkose betrug 1—2 Std.

## Ergebnisse.

### *A. Allgemeines Verhalten der Tiere in Äthernarkose.*

Die Narkosetiefe ließ sich in unseren Versuchen nur in geringen Grenzen variieren, da schon bei mäßiger Verringerung der Tropfgeschwindigkeit des Äthers der Tonus der Muskulatur zunahm und rasch Streck- und Laufbewegungen einsetzten. Umgekehrt führte bereits eine geringe Steigerung der Ätherzufuhr rasch zum Tode des Tieres unter dem Bild eines unbeeinflußbaren Atem- und Herzstillstandes, da die therapeutische Breite des Äthers beim Hund im Gegensatz zum Menschen außerordentlich gering ist. Auf diese Weise verloren wir drei Versuchstiere. Zwischen diesen beiden Extremen lassen sich an Hand der von uns geprüften somatischen Reflexe allenfalls zwei unterschiedliche Stadien definieren, wie aus Tab. 2 zu ersehen ist. Aus dieser Tabelle geht außerdem hervor, daß in dem von uns als „tief" bezeichneten Stadium der Äthernarkose, das sich aus den erwähnten Gründen nicht nennenswert abschwächen ließ, das Reflexbild im wesentlichen

bereits dem einer maximal tiefen Pernoctonnarkose entsprach. Auffallend war, daß die Pupillen selbst in der leichtesten Äthernarkose mit ausgeprägten Streck- und Laufbewegungen maximal weit und lichtstarr waren und somit keinen Anhalt für das Erreichen des sog. kritischen Stadiums boten. Dies steht im Gegensatz zu dem Verhalten der Pupillen des Hundes in Barbituratnarkose und ganz besonders zu der

Tabelle 2. *Ausfall der somatischen Reflexe in Äther- und Pernoctonnarkose.*

| Reflex | Äthernarkose | | Pernoctonnarkose | |
|---|---|---|---|---|
| | „sehr tief" | „tief" | „sehr tief" | „tief" |
| Reaktion auf Erschütterung der Unterlage | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Schmerzreflex (Leistenbeuge) | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Schmerzreflex (Nase) | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Akustischer Reflex (schrilles Pfeifen) | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Conjunctivalreflex | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Cornealreflex | ∅ | ∅ | ∅ | (+) |
| Rückenhautreflex | ∅ | ∅ | ∅ | (+) |
| Schwanzreflex | ∅ | (+) | ∅ | (+) |
| Lidschlagreflex (Berührung des Augenwinkels) | ∅ | (+) | ∅ | (+) |
| Lidschlagreflex (Lichteinfall) | ∅ | ∅ | (+) | + |
| Analreflex | ∅ | ∅ | + | + |
| Pupillenreaktion auf Licht | ∅ | ∅ | + | + |
| Interdigitalreflex | (+) | (+) | + | + |
| Pupillenweite | | | | |
| Nickhautstellung | | | | |

allgemein bekannten Ätherwirkung auf die menschliche Pupille. Ein weiterer Unterschied zwischen Äther- und Pernoctonnarkose zeigte sich in der Reaktion des Sphincter ani, der unter Äther maximal kontrahiert, unter Pernocton dagegen maximal erschlafft ist. Etwa 15 min nach Abbrechen der Narkose reagierten die Tiere wieder auf Zuruf und machten torkelnde Gehversuche. Postnarkotisches Erbrechen wurde nie beobachtet.

### *B. Der Kreislauf in Äthernarkose.*

*1. Die Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen.* Ein Überblick über Richtung und Größenordnung der Veränderungen aller von uns gemessenen physikalischen Kreislaufgrößen sei am Beispiel eines typischen Versuches in Abb. 1 gegeben. Auffallend ist der starke Anstieg der Herzfrequenz, die ebenfalls beträchtliche Zunahme von Pulswellengeschwindigkeit und elastischem Widerstand, während peripherer Widerstand und diastolischer Druck bei leicht absinkendem Minutenvolumen und stark reduziertem Schlagvolumen in diesem Versuch nahezu konstant bleiben. Die entsprechenden Zahlenwerte für alle Versuche sind in Tab. 3 aufgeführt. Das in Abb. 1 als typisch bezeichnete Verhalten von Herzfrequenz, Schlagvolumen, elastischem Widerstand, Pulswellen-

geschwindigkeit und Blutdruck wird in fast allen Versuchen wiedergefunden. Nicht so einheitlich erscheinen dagegen die Veränderungen von Minutenvolumen und peripherem Widerstand, wenn man sie zum jeweiligen Ausgangswert vor der Narkose in Beziehung setzt.

Die Erklärung für dieses scheinbar uneinheitliche Verhalten von Minutenvolumen und peripherem Widerstand liegt darin, daß die vor Narkose bestimmten Ausgangswerte in einem weiten Bereich streuen. Die Verwendung dieser *Ausgangswerte* als Bezugsgrößen für die Bewertung der in Narkose gemessenen Werte kann dann irreführend sein, wenn die in Narkose auftretenden Veränderungen innerhalb der Variationsbreite der Ausgangswerte liegen. Da die Narkose eine maximale Ruhigstellung des Organismus bewirkt, ist es deshalb sinnvoller, alle Veränderungen von Kreislauf und Stoffwechsel auf die Werte solcher Versuche im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand zu beziehen, die bei optimaler Beruhigung des Tieres erhalten werden konnten. In früheren Arbeiten [7, 9, 10] ist auf die Wichtigkeit gerade der Unterscheidung zwischen jeweiligem *Ausgangswert* und *optimalem Ruhewert* hingewiesen und gezeigt worden, welche Fehlschlüsse bei alleiniger Verwendung der Ausgangswerte möglich sind. Als Kriterium für die Beurteilung des Ruhezustandes wurde das Minutenvolumen gewählt. Bei jahrelanger, intensiver Beschäftigung mit den Tieren war es möglich, echte Minimalwerte für das Minutenvolumen im Wachzustand zu erhalten, die in Tab. 4 mit den dazugehörigen, gleichzeitig gemessenen anderen Kreislaufgrößen und den im gleichen Versuch bestimmten Stoffwechselwerten zusammengestellt sind. Bei derartigen optimalen Ruheversuchen finden sich stets Minimalwerte auch für Schlagvolumen, Herzfrequenz und Sauerstoffverbrauch

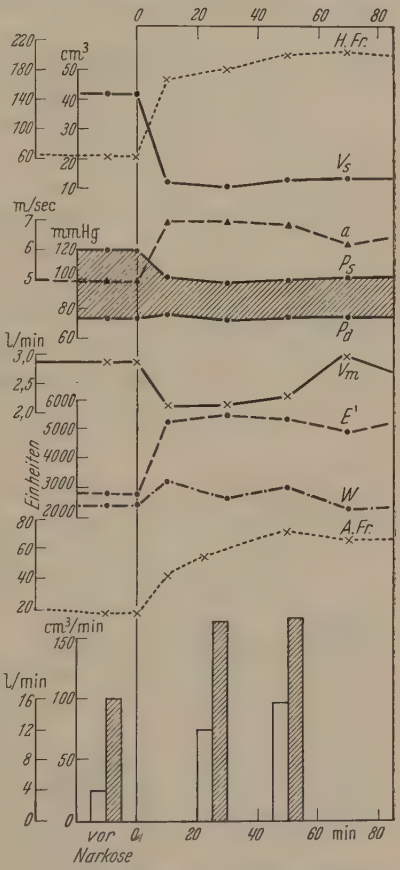



Abb. 1. Beispiel eines vollständigen Versuches in Äthernarkose. Hund Erwin; 21,0 kg; 10. 12. 54 (siehe Tab. 3 und 6). Schraffierte Säulen: Sauerstoffverbrauch in cm³/min; weiße Säulen: Atemminutenvolumen in Liter/min.

Tabelle 3. *Verhalten der physikalischen Kreislaufgrößen in Äthernarkose.*

| Name Gewicht Datum | Zeit (min) | $P_s$ (mmHg) | $P_d$ (mmHg) | Herzfrequenz (pro min) | $a$ (m/sec) | $V_s$ (cm³) | $V_m$ (l/min) | $E'$ (dyn/cm⁵) | $W$ $\left(\frac{\text{dyn}\cdot\text{sec}}{\text{cm}^5}\right)$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dubas | vor | | | | | | | | |
| 26,8 kg | Narkose | 129 | 81 | 73 | 4,43 | 56,0 | 4,07 | 2330 | 2030 |
| 13.12.54 | 0—20 | 101 | 85 | 157 | 7,13 | 12,5 | 1,96 | 3460 | 3810 |
| | 20—40 | 99 | 82 | 163 | 6,47 | 9,9 | 1,61 | 4650 | 4500 |
| | 40—60 | 103 | 85 | 181 | 6,60 | 11,3 | 2,02 | 4560 | 3750 |
| Erwin | vor | | | | | | | | |
| 21,0 kg | Narkose | 117 | 74 | 81 | 4,47 | 52,5 | 4,25 | 2220 | 1771 |
| 19.11.54 | 0—20 | 87 | 68 | 188 | 5,80 | 11,8 | 2,22 | 4470 | 2780 |
| | 20—40 | 96 | 75 | 186 | 6,67 | 10,8 | 2,01 | 5240 | 3400 |
| | 40—60 | 97 | 73 | 195 | 5,66 | 13,5 | 2,63 | 4820 | 2280 |
| Erwin | vor | | | | | | | | |
| 21,4 kg | Narkose | 121 | 76 | 68 | 5,04 | 42,5 | 2,89 | 2870 | 2530 |
| 10.12.55 | 0—20 | 102 | 77 | 171 | 7,00 | 12,8 | 2,19 | 5300 | 3260 |
| | 20—40 | 98 | 74 | 186 | 7,06 | 11,8 | 2,19 | 5510 | 2760 |
| | 40—60 | 100 | 75 | 205 | 6,95 | 13,7 | 2,35 | 5475 | 3070 |
| | 60—80 | 103 | 76 | 212 | 6,30 | 14,4 | 3,05 | 4950 | 2340 |
| Lucie | vor | | | | | | | | |
| 24,0 kg | Narkose | 120 | 75 | 83 | 6,20 | 24,5 | 2,04 | 4980 | 3770 |
| 13.10.54 | 0—20 | 110 | 80 | 161 | 5,45 | 22,4 | 3,62 | 3620 | 2080 |
| | 20—40 | 125 | 93 | 187 | 5,92 | 19,5 | 3,78 | 4265 | 2354 |
| | 40—60 | 130 | 100 | 183 | 6,50 | 17,2 | 3,13 | 4735 | 3025 |
| | 60—80 | 120 | 93 | 202 | 6,38 | 14,6 | 2,94 | 5020 | 2900 |
| Otto | vor | | | | | | | | |
| 23,0 kg | Narkose | 109 | 77 | 84 | 6,33 | 33,9 | 2,87 | 2550 | 2580 |
| 12.6.54 | 20—40 | 92 | 65 | 162 | 7,70 | 13,9 | 2,25 | 5260 | 2780 |
| | 40—60 | 104 | 70 | 156 | 7,81 | 18,0 | 2,80 | 5040 | 2450 |
| Otto | vor | | | | | | | | |
| 23,0 kg | Narkose | 130 | 83 | 100 | 5,47 | 38,2 | 3,25 | 3620 | 2380 |
| 8.10.54 | 0—20 | 115 | 86 | 167 | 7,20 | 15,3 | 2,55 | 5235 | 3315 |
| | 20—40 | 123 | 85 | 193 | 6,94 | 22,5 | 4,35 | 4570 | 1895 |
| | 40—60 | 127 | 87 | 188 | 6,94 | 23,7 | 4,46 | 4570 | 1900 |
| Otto | vor | | | | | | | | |
| 23,5 kg | Narkose | 125 | 81 | 124 | 4,82 | 41,3 | 5,12 | 2825 | 1170 |
| 14.12.54 | 20—40 | 116 | 80 | 173 | 5,62 | 23,4 | 4,05 | 4120 | 1930 |
| | 40—60 | 116 | 82 | 175 | 6,39 | 18,0 | 3,16 | 5100 | 2480 |
| | 60—80 | 108 | 76 | 172 | 6,77 | 15,5 | 2,74 | 5380 | 2855 |
| Struppi | vor | | | | | | | | |
| 15,5 kg | Narkose | 113 | 89 | 108 | 5,94 | 19,1 | 2,06 | 3400 | 4630 |
| 29.5.54 | 0—20 | 167 | 137 | 166 | 9,33 | 12,8 | 2,12 | 6360 | 5360 |
| | 20—40 | 166 | 133 | 158 | 5,54 | 23,2 | 3,64 | 3840 | 3290 |
| Xaver | vor | | | | | | | | |
| 19,5 kg | Narkose | 141 | 98 | 63 | 7,14 | 26,5 | 1,67 | 4390 | 5650 |
| 27.10.54 | 0—20 | 110 | 84 | 208 | 7,84 | 11,4 | 2,38 | 6150 | 3260 |
| | 20—40 | 119 | 94 | 246 | 7,84 | 10,5 | 2,60 | 6400 | 3270 |
| | 60—80 | 119 | 90 | 236 | 7,07 | 12,2 | 2,05 | 6450 | 2915 |

*Tabelle 3.* (Fortsetzung.)

| Name Gewicht Datum | Zeit (min) | $P_s$ (mmHg) | $P_d$ (mmHg) | Herzfrequenz (pro min) | $a$ (m/sec) | $V_s$ ($cm^3$) | $V_m$ (l/min) | $E'$ (dyn/$cm^5$) | $W$ (dyn·sec/$cm^5$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Xaver | vor | | | | | | | | |
| 19,0 kg | Narkose | 132 | 87 | 72 | 5,26 | 39,8 | 2,86 | 3070 | 3030 |
| 16.12.54 | 0—20 | 121 | 88 | 193 | 6,00 | 17,7 | 3,41 | 5050 | 2430 |
| | 20—40 | 118 | 85 | 196 | 7,97 | 13,7 | 2,69 | 6500 | 3000 |
| | 40—60 | 106 | 78 | 190 | 9,70 | 12,3 | 2,45 | 5355 | 2741 |
| | 60—80 | 105 | 83 | 193 | 6,77 | 11,9 | 2,20 | 5330 | 3420 |

sowie maximale Werte für den peripheren Widerstand, während der elastische Widerstand sich wechselnd verhält.

Die Mittelwerte der relativen Veränderungen aller Kreislaufgrößen gegenüber den in Tab. 4 aufgeführten Werten sind in Abb. 2 graphisch dargestellt. In dieser Abbildung erscheint nun auch das Verhalten von Minutenvolumen und peripherem Widerstand einheitlich, indem sich für das Minutenvolumen ein deutlicher Anstieg und für den peripheren Widerstand ein mäßiger Abfall ergibt.

Tabelle 4. *Ruhewerte der wichtigsten Kreislaufgrößen bei minimalem Minutenvolumen sowie die im gleichen Versuch bestimmten Werte von respiratorischem Stoffwechsel und Atmung.*

| Name | Herzfrequenz (pro min) | $P_s$ (mm Hg) | $P_d$ (mm Hg) | $a$ (m/sec) | $V_s$ ($cm^3$) | $V_m$ (l/min) | $E'$ (dyn/$cm^5$) | $W$ (dyn·sec/$cm^5$) | $O_2$-Verbrauch ($cm^3$/min) | $CO_2$-Ausschdg. ($cm^3$/min) | $RQ$ | Atemvolumen (l/min) | Atemfrequenz (pro min) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Blacky | 82 | — | — | — | — | — | — | — | 92 | 67 | 0,73 | 2,94 | 16 |
| Dubas | 61 | 118 | 79 | 4,42 | 53,2 | 3,24 | 1990 | 2420 | — | — | — | — | — |
| Erwin | 58 | 112 | 81 | 5,70 | 28,8 | 1,67 | 2920 | 4530 | 85 | 62 | 0,73 | 2,90 | 8 |
| Lucie | 83 | 120 | 75 | 6,20 | 24,5 | 2,04 | 4980 | 3770 | 128 | 93 | 0,73 | 2,86 | 12 |
| Otto | 56 | 110 | 77 | 6,04 | 27,0 | 1,52 | 3260 | 4780 | 80 | 59 | 0,74 | 2,40 | 11 |
| Struppi | 108 | 113 | 89 | 5,94 | 19,1 | 2,06 | 3400 | 4630 | — | — | — | — | — |
| Xaver | 63 | 141 | 98 | 7,14 | 26,5 | 1,67 | 4390 | 5650 | 104 | 74 | 0,71 | 2,76 | 8 |

In den bisherigen Ausführungen wurden die Wirkungen des Äthers im Vergleich sowohl mit den Ausgangswerten als auch mit den optimalen Ruhewerten beschrieben. Zum Vergleich mit dem Verhalten in tiefer Pernoctonnarkose (50—60 mg/kg i.v.) wurden Versuche an zwei Hunden herangezogen, bei denen wir über Jahre hindurch Ruhebestimmungen und zahlreiche Pernoctonnarkosen durchgeführt haben. Wie Abb. 3 zeigt, steigt bei beiden Narkosen die Herzfrequenz über den höchsten in Ruhe beobachteten Wert an, bei Äther in viel stärkerem Maße als bei Pernocton, während das Schlagvolumen den niedrigsten Ruhewert in beiden Narkosen weit unterschreitet. Die Werte für das Minutenvolumen bleiben

dabei stets innerhalb der Variationsbreite der Ruhewerte. Ein prinzipieller Unterschied zwischen Äther und Pernocton ergibt sich demnach aus Abb. 3 nicht, wenn man von der relativ stärkeren Steigerung der Herzfrequenz unter Äther absieht. Für den elastischen und den peripheren Widerstand scheint nach Abb. 4 auf den ersten Blick gleichfalls kein wesentlicher Unterschied zu bestehen. Bei näherer Betrachtung fällt jedoch auf, daß die Werte für den elastischen Widerstand in Äther die Pernoctonwerte immer überschreiten, und umgekehrt die Werte für den peripheren Widerstand in Äther gewöhnlich unter denen der Pernoctonnarkose gefunden werden. Hieraus ergibt sich ein erheblicher Unterschied in der Wirkung der beiden Narkotica auf den Dämpfungsfaktor $E'/W$ des arteriellen Systems, der unter Pernocton praktisch keine Veränderung gegenüber den Ruhewerten erfährt, unter Äther dagegen durchschnittlich verdoppelt wird.

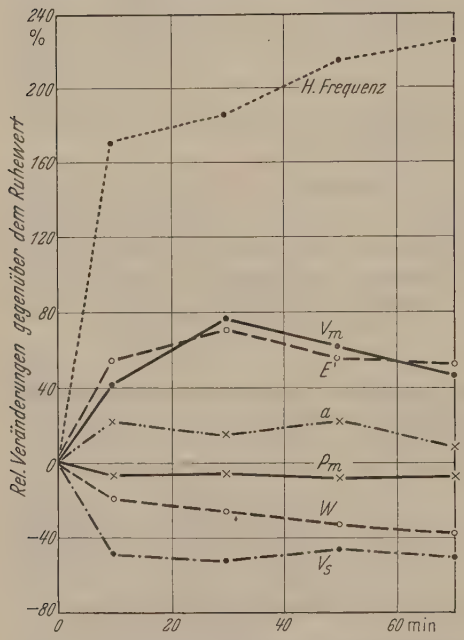



Abb. 2. Relative Veränderungen der Kreislaufwerte in „tiefer" Äthernarkose. Prozentuale Abweichung gegenüber den Werten bei minimalem Minutenvolumen im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand (siehe Tab. 4); Mittelwerte aus allen Versuchen.

### 2. *Die Veränderungen der Reaktivität des Kreislaufs.*

*a) Der Carotissinusreflex.* In einer früheren Arbeit [23] konnte gezeigt werden, daß die Reaktion auf einseitige Carotissinusentlastung sich in Barbituratnarkose mit dem Grad der Narkosetiefe nicht nur quantitativ, sondern auch dem Reaktionstyp nach ändert: In sehr tiefer Narkose ist der Reflex vollkommen erloschen, um bei abnehmender Narkosetiefe mit einer deutlich negativen Nachschwankung wiederzukehren. Diese negative Nachschwankung, die von manchen Autoren (siehe Heymans [15]) als typisch für das Reflexbild bei Carotissinusentlastung angesehen wird, wird nach unseren Erfahrungen beim unnarkotisierten Hund, d. h. bei völlig intaktem Regulationssystem, meistens vermißt, so daß ein fast rechteckförmiger Blutdruckverlauf resultiert.

In Äthernarkose war überraschenderweise ein völlig neues Bild dieses Reflexes zu beobachten, nämlich ein träger Anstieg und Abfall des Blutdrucks in Form eines flachen, stumpfwinkligen Dreiecks. In Abb. 5 sind diese drei Reaktionstypen einander gegenübergestellt, wie sie bei *einem* Hund in Ruhe a), in tiefer Pernoctonnarkose b) und in tiefer Äther-

narkose c) registriert wurden, wobei für die Narkosetiefe die Kriterien der Tab. 2 gewählt sind. Zu beachten ist weiterhin, daß in Äthernarkose keine Veränderung von Herz- und Atemfrequenz bei Carotissinusentlastung auftritt. In sehr tiefer Äthernarkose ist der Carotissinusreflex ebenso wie in sehr tiefer Barbituratnarkose völlig erloschen. Eine Übersicht über die zahlenmäßige Verteilung der drei Reaktionstypen gibt

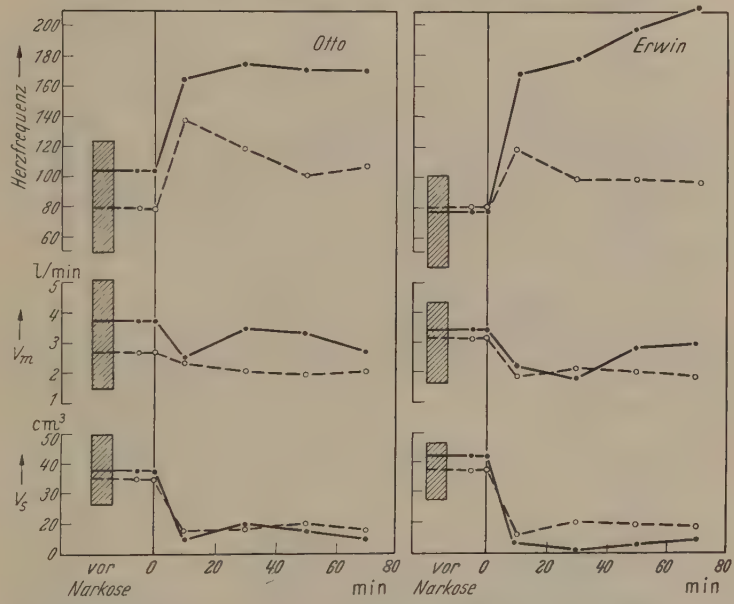



Abb. 3. Herzfrequenz, Schlag- und Minutenvolumen in Äthernarkose (ausgezogene Linien) und Pernoctonnarkose (gestrichelte Linien). Mittelwerte aus allen Versuchen an den Hunden Otto und Erwin, bezogen auf die durchschnittlichen Ausgangswerte. Die schraffierten Säulen geben die Variationsbreite der Ruhewerte wieder; die untere Begrenzung der Säulen entspricht den Werten der Tab. 4.

Tab. 5. Danach findet man unter den positiven Reaktionen beim pharmakologisch unbeeinflußten Tier den Rechtecktyp in 91%, die negative Nachschwankung in 9%, die Dreieckform überhaupt nicht. In Barbituratnarkose überwiegt mit 66% die Form mit negativer Nachschwankung, wohingegen die Rechteckform mit 25% und die Dreieckform mit 9% auftreten. In Äthernarkose herrscht dagegen die Dreieckform mit 92% bei weitem vor. In der Diskussion soll daher die Rechteckform kurz als Normaltyp, die Dreieckform als Äthertyp und die Form mit ausgeprägter negativer Nachschwankung als Barbiturattyp bezeichnet werden.

b) *Die Wirkung von Adrenalin.* Bei den Untersuchungen über die Adrenalinwirkung in Narkose wurde bewußt die Dosis von 0,1 $\gamma$/kg nicht überschritten. Diese Dosis ruft beim pharmakologisch unbeeinflußten Tier gerade noch eine Blutdruckreaktion hervor, ohne das Tier in

Erregung zu versetzen. Außerdem würde beim narkotisierten Tier eine höhere Dosierung feinere Unterschiede in der Reaktivität nicht mehr hervortreten lassen. Nach 0,1 $\gamma$/kg werden beim wachen Tier nur mäßig starke, mehrgipflige initiale Blutdruckschwankungen mit nachfolgendem, geringem, tachykardem Blutdruckabfall registriert. An einer derartigen

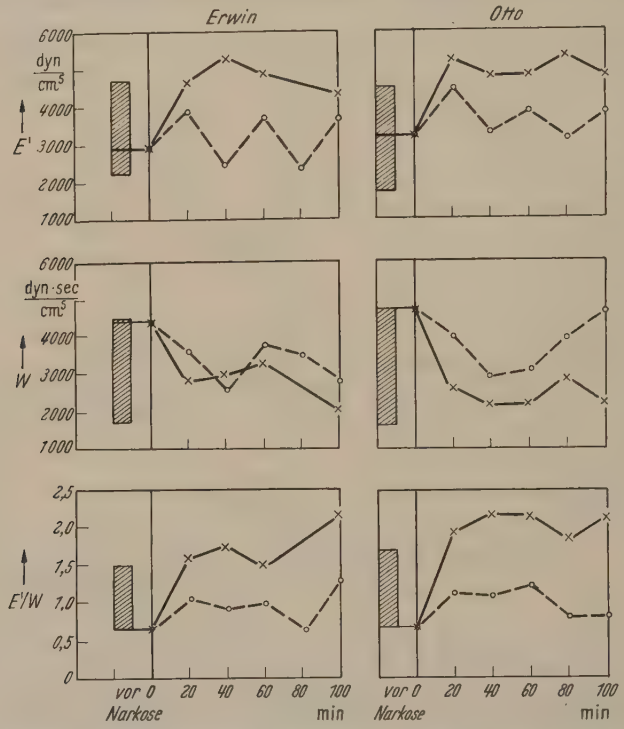



Abb. 4. Elastischer Widerstand, peripherer Widerstand und Dämpfungsfaktor $E'/W$ in Äthernarkose (ausgezogene Linien) und Pernoctonnarkose (gestrichelte Linien). Mittelwerte aus allen Versuchen an den Hunden Erwin und Otto, bezogen auf die Werte bei minimalem Minutenvolumen in pharmakologisch unbeeinflußtem Zustand (siehe Tab. 4). Variationsbreite der Ruhewerte schraffiert.

Kurve ist die Funktionstüchtigkeit der Regulationsmechanismen des Kreislaufs deutlich zu erkennen (Abb. 6a). Ganz anders das Bild in Barbituratnarkose: An Stelle der rasch aufeinanderfolgenden Reaktionen von Blutdruck und Herzfrequenz tritt ein langsamer Schwingungsvorgang mit ausgeprägtem, initialen Gipfel ohne jegliche Änderung der Herzfrequenz (Abb. 6b). In Äthernarkose findet sich ein ähnlicher Reaktionstyp, jedoch mit einem lang überdauernden Blutdruckabfall und ohne wesentlichen initialen Blutdruckanstieg (Abb. 6c).

c) *Die Reaktion auf Kohlensäure und Sauerstoff.* Auf Beatmung mit einem Gemisch von 4 oder 8% Kohlensäure in Luft über mehrere Minuten

trat in keinem Stadium der Äthernarkose eine Veränderung von Blutdruck oder Herzfrequenz auf. Beatmung mit reinem Sauerstoff bewirkte eine Verringerung der Herzfrequenz um durchschnittlich 20—30 Schläge pro Minute. Änderungen des Blutdrucks wurden auch dabei nicht beobachtet.

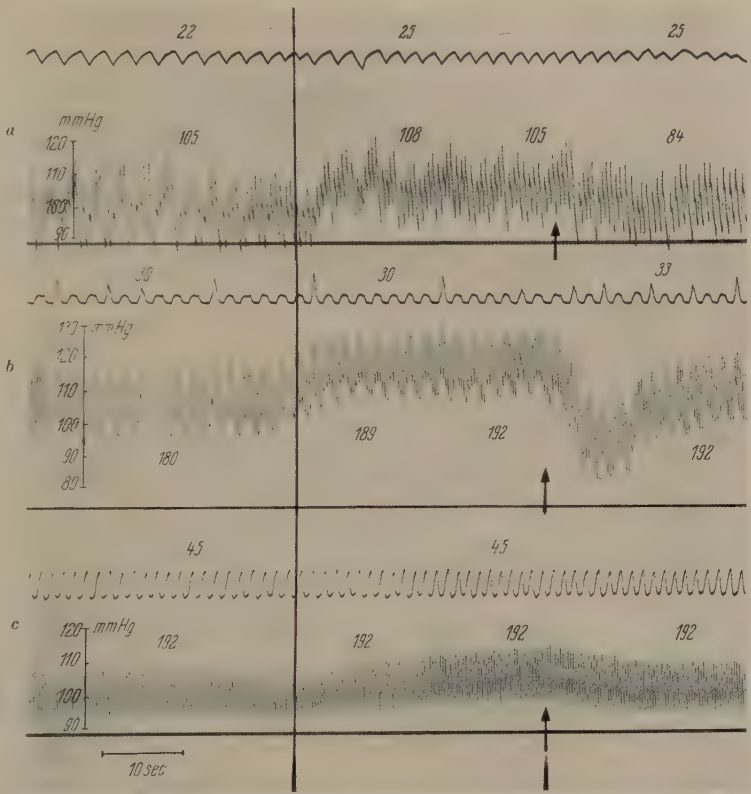



Abb. 5. Atmung (obere Kurve: Druck in der Atemmaske, seitenständig registriert) und Blutdruck (untere Kurve) bei Carotissinusreflex. Durchgehende Lichtmarke: Abklemmung einer Carotis; Pfeil: Lösung der Abklemmung. Versuche an Hund Otto: *a* im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand; *b* in „tiefer" Pernoctonnarkose (56 mg/kg i. v., 85 min nach Narkosebeginn); *c* in „tiefer" Äthernarkose. Die Zahlen geben die jeweilige Atem- bzw. Herzfrequenz an.

Tabelle 5. *Häufigkeit der verschiedenen Reaktionstypen des Carotissinusreflexes im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand, in Pernocton- und in Äthernarkose.*

| Zustand bzw. Narkose | Positive Reaktionen | Reaktionstypen a | | b | | c | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| unbeeinflußt | 46 | 42 | 91% | 4 | 9% | 0 | 0% |
| Barbitursäure | 68 | 17 | 25% | 45 | 66% | 6 | 9% |
| Äther | 13 | 1 | 8% | 0 | 0% | 12 | 92% |

*C. Respiratorischer Stoffwechsel und Atmung in Äthernarkose.*

Das Verhalten von respiratorischem Gaswechsel und Atmung während einer Äthernarkose ist in Tab. 6 zusammengefaßt. Besonders eindrucksvoll ist die Steigerung von Atemminutenvolumen und Atemfrequenz, die in den meisten Fällen mehr als das Doppelte des Ausgangs-

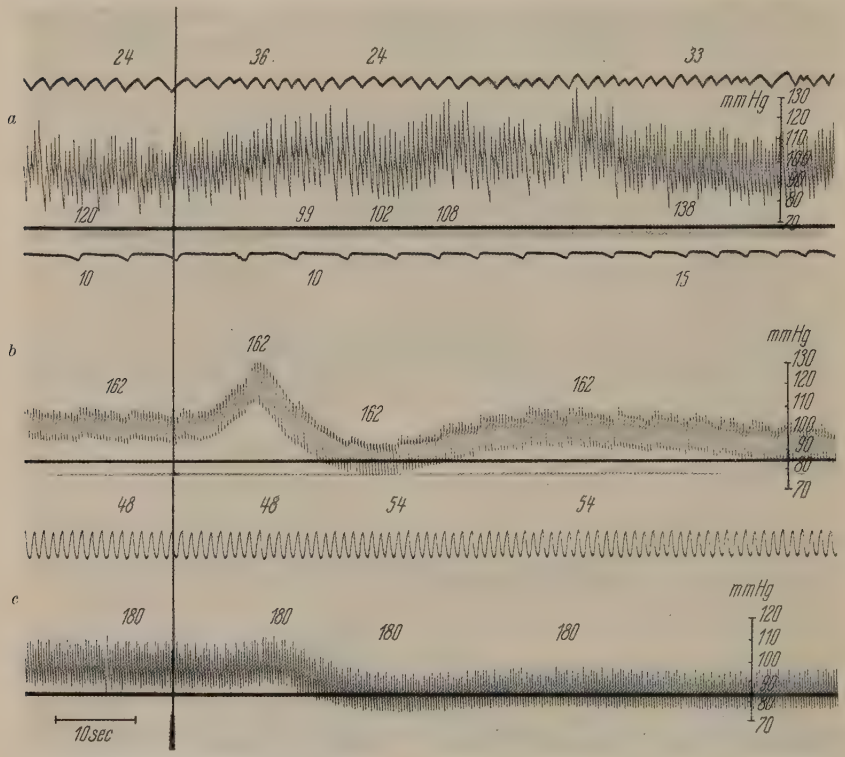



Abb. 6. Atmung (obere Kurve) und Blutdruck (untere Kurve) bei Adrenalininjektion. Lichtmarke: Injektion von 0,1 $\gamma$/kg Adrenalin i.v. Versuche an Hund Otto: *a* im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand; *b* in „sehr tiefer" Pernoctonnarkose (56 mg/kg i.v., 20 min nach Narkosebeginn); *c* in „sehr tiefer" Äthernarkose. Die Zahlen geben die jeweilige Atem- bzw. Herzfrequenz an.

werts beträgt. Ebenso stieg bei den meisten Versuchen der Sauerstoffverbrauch stark an, wobei der *RQ* entsprechend der Hyperventilation Werte zwischen 0,8 und 1,1 erreichte. Atemminutenvolumen und Sauerstoffverbrauch waren eng miteinander gekoppelt, indem eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs stets mit einer entsprechenden Zunahme des Atemminutenvolumens einherging.

Wie aus der Literatur bekannt, besteht zwischen Atemminutenvolumen und Sauerstoffverbrauch eine annähernd lineare Beziehung. Für den ruhenden, wachen Hund haben wir diese Beziehung in einer früheren

Arbeit ausführlich besprochen [7, 9] und zeigen können, daß sie auch in Barbituratnarkose gewahrt bleibt, so daß sich die Werte für Sauerstoffverbrauch und Atemminutenvolumen um die gleiche Regressionslinie gruppieren. In Abb. 7 ist diese Regressionslinie für drei Hunde wieder-

Tabelle 6. *Verhalten von respiratorischem Stoffwechsel und Atmung in Äthernarkose.*

| Name Gewicht Datum | Zeit (min) | $O_2$-Verbrauch ($cm^3$/min) | $CO_2$-Ausscheidg. ($cm^3$/min) | *RQ* | Atemvolumen (l/min) | Atemfrequenz (pro min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Blacky | vor Narkose | 143 | 100 | 0,70 | 5,89 | 30 |
| 24,0 kg | 5—15 | 201 | 209 | 1,04 | 15,55 | 76 |
| 10. 6. 54 | 40—60 | 173 | 148 | 0,86 | 13,00 | 72 |
| | 65—75 | 202 | 173 | 0,86 | 17,13 | 60 |
| Erwin | vor Narkose | 115 | 102 | 0,89 | 4,48 | 19 |
| 21,4 kg | 25—35 | 124 | 94 | 0,75 | 8,66 | 52 |
| 19. 11. 54 | 70—80 | 125 | 117 | 0,93 | 9,14 | 56 |
| Erwin | vor Narkose | 104 | 103 | 0,99 | 4,00 | 18 |
| 21,4 kg | 20—30 | 161 | 158 | 0,98 | 12,00 | 56 |
| 10. 12. 54 | 45—55 | 164 | 160 | 0,98 | 15,80 | 72 |
| Lucie | vor Narkose | 125 | 103 | 0,82 | 3,66 | 12 |
| 24,0 kg | 10—20 | 223 | 201 | 0,90 | 10,38 | 74 |
| 13. 10. 54 | 35—45 | 119 | 86 | 0,72 | 5,12 | 60 |
| Otto | vor Narkose | 115 | 95 | 0,83 | 3,98 | 14 |
| 23,0 kg | 35— 45 | 147 | 121 | 0,83 | 6,58 | 49 |
| 12. 6. 54 | 90—100 | 147 | 127 | 0,86 | 10,19 | 68 |
| | 135—145 | 184 | 176 | 0,96 | 16,02 | 71 |
| Otto | vor Narkose | 122 | 100 | 0,82 | 5,12 | 19 |
| 23,0 kg | 5—15 | 125 | 129 | 1,00 | 9,87 | 64 |
| 8. 10. 54 | 30—40 | 126 | 89 | 0,71 | 4,26 | 53 |
| Otto | vor Narkose | 157 | 137 | 0,88 | 5,55 | 22 |
| 23,5 kg | 25—35 | 173 | 148 | 0,86 | 9,85 | 56 |
| 14. 12. 54 | 70—80 | 128 | 83 | 0,64 | 3,90 | 56 |
| Otto | vor Narkose | 148 | 114 | 0,77 | 4,93 | 18 |
| 23,5 kg | 15—25 | 134 | 134 | 1,00 | 8,80 | 62 |
| 11. 1. 55 | 40—60 | 170 | 170 | 1,00 | 10,20 | 68 |
| Xaver | vor Narkose | 120 | 85 | 0,72 | 9,65 | 64 |
| 19,2 kg | 25—35 | 100 | 108 | 1,09 | 4,70 | 42 |
| 15. 6. 54 | 60—70 | 257 | 265 | 1,03 | 7,90 | 45 |

gegeben. Gleichzeitig sind die Werte eingezeichnet, die bei diesen Hunden in Äthernarkose gefunden wurden: Sie liegen fast alle weit oberhalb der Regressionslinie. Noch deutlicher wird dieses Verhalten durch Abb. 8 demonstriert, in der die Maximal- und Minimalwerte für Sauerstoffverbrauch und Atemminutenvolumen für zwei Hunde in pharmakologisch unbeeinflußtem Zustand, in Pernocton- und in Äthernarkose dargestellt sind. Selbst ein hoher Sauerstoffverbrauch, wie er beim erregten, wachen

Tier oder im Excitationsstadium einer Pernoctonnarkose gefunden wird, ist in keinem Fall mit einem so hohen Atemminutenvolumen verbunden wie bei ähnlich hohem Sauerstoffverbrauch unter Äther. Wie an anderer Stelle beschrieben [3, 4, 6], blieben selbst im Stadium maximaler Kältegegenregulation mit stärkstem Muskelzittern die erreichten Atemvolumina, bezogen auf den Sauerstoffverbrauch, weit unter den maximalen

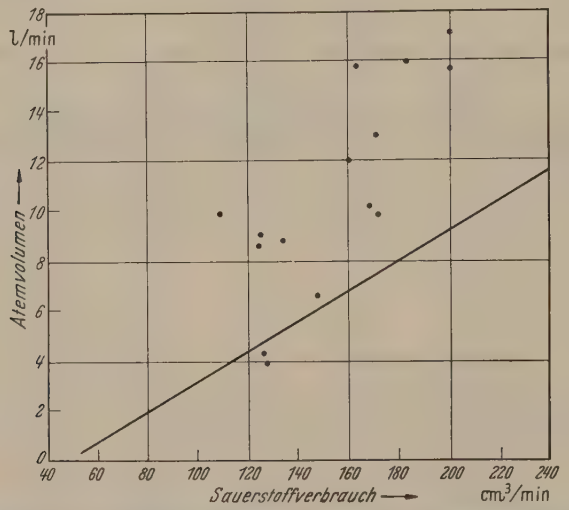



Abb. 7. Beziehung zwischen Atemminutenvolumen (Ordinate) und Sauerstoffverbrauch (Abszisse). Die ausgezogene Linie gibt die aus 94 Ruheversuchen für die Hunde Otto, Erwin und Blacky berechnete Regressionsgerade wieder. Die eingetragenen Punkte entsprechen den Werten in Ätharnarkose bei den gleichen Hunden.

Werten der betreffenden Tiere unter Äther. Ebenso zeigen die Minimalwerte in Abb. 8, daß das Atemminutenvolumen sowohl absolut als auch im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch unter Äther viel höher gefunden wird als in Ruhe oder in Pernoctonnarkose. Aus diesen Ergebnissen folgt zwingend, daß dem Äther eine atemsteigernde Wirkung zukommt, die nicht als Folge des gesteigerten Sauerstoffverbrauches zu erklären ist. Wahrscheinlich wird die Atemsteigerung durch eine spezifische Wirkung des Äthers auf das Zentralnervensystem hervorgerufen, wie es Kärber und Lendle[18] bereits am Kaninchen nachgewiesen haben.

Die *Reaktivität der Atmung* auf Kohlensäurezusatz zur Atemluft war erloschen. Auf Grund der Befunde läßt sich jedoch nicht entscheiden, ob das Atemzentrum gelähmt ist, oder ob der Äther eine so starke Atemsteigerung bewirkt, daß eine weitere Steigerung durch einen Kohlensäurereiz nicht mehr möglich ist.

Die Veränderungen der Atmung bei Verabreichung eines Sauerstoffmangelgemisches (8% $O_2$ in $N_2$) bzw. bei reiner Sauerstoffatmung für die Dauer von 5 min waren nur geringfügig und in der Richtung uneinheitlich, im Gegensatz zur Pernoctonnarkose, bei der reiner Sauerstoff eine Reduktion der Atmung bis zum Atem-

stillstand und Sauerstoffmangelgemische eine kräftige Atemsteigerung bewirkten. Blutgasanalysen wurden wegen der methodischen Schwierigkeiten bei ätherhaltigem Blut nicht durchgeführt. Orientierende Messungen mit dem Carotisschlingen-Oxymeter[1, 2] ergaben in sehr tiefer Äthernarkose eine mäßige Hypoxämie von

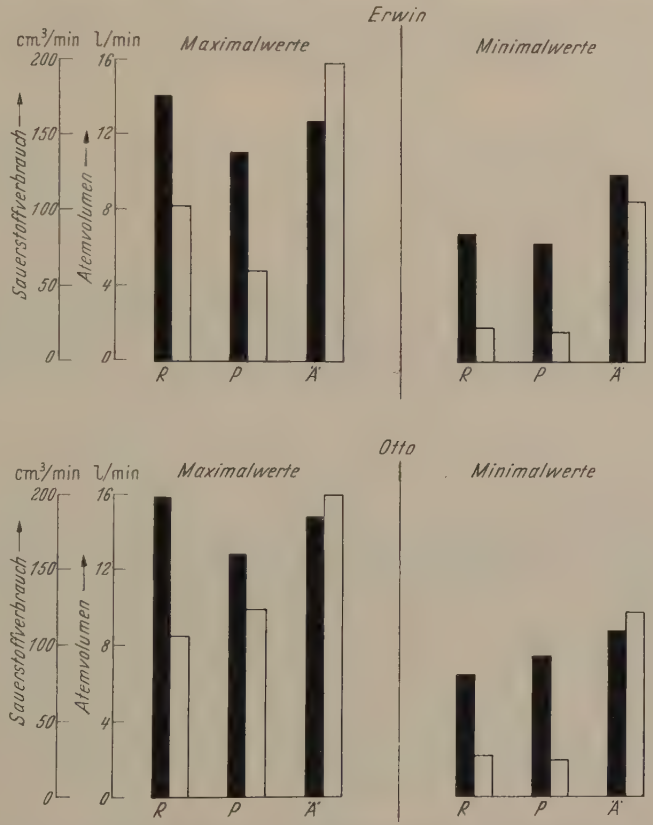



Abb. 8. Die höchsten und niedrigsten jeweils beobachteten Werte für Sauerstoffverbrauch (schwarze Säulen) und Atemminutenvolumen (weiße Säulen). Versuche an den Hunden Erwin und Otto: im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand (*R*), in Pernoctonnarkose (*P*) und in Äthernarkose (*Ä*).

85—90% (Abb. 9). Bei Mangelatmungsversuchen fiel die arterielle Sättigung langsam weiter ab, beim Umschalten auf reinen Sauerstoff stieg die Kurve nach kurzer Latenzzeit steil an und ging nach etwa 20 sec in den flach ansteigenden Schenkel über (Abb. 9); die zeitlichen Abmessungen der einzelnen Kurventeile verhielten sich demnach wie beim wachen Tier[1].

## Diskussion.

Nach den mitgeteilten Ergebnissen ist die Kreislaufumstellung in Äthernarkose charakterisiert durch

1. extreme Steigerung der Herzfrequenz,

2. geringfügige Abnahme des Mitteldrucks und des diastolischen Drucks bei deutlicher Reduktion der Amplitude,

3. Zunahme des Minutenvolumens trotz starker Abnahme des Schlagvolumens,

4. Zunahme des elastischen bei Abnahme des peripheren Widerstandes und

5. starken Anstieg des Dämpfungsfaktors $E'/W$

(stets bezogen auf den optimalen Ruhewert und nicht auf den jeweiligen Ausgangswert).

Diese Befunde weichen von den aus der Literatur bekannten insofern ab, als die meisten Autoren beim Menschen nur eine geringe Steigerung der Herzfrequenz und eine Zunahme des Schlagvolumens angeben ([5, 20, 30]). Diese Diskrepanz ist aber

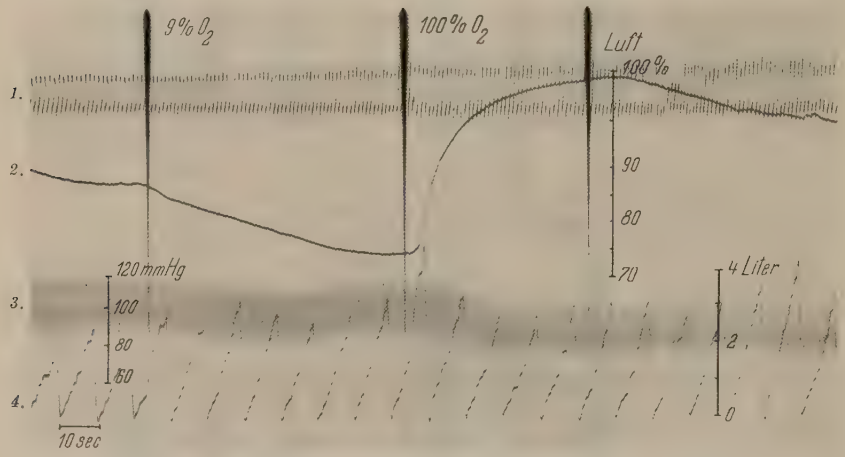



Abb. 9. Reaktion auf Hypoxie und auf reine Sauerstoffatmung in „tiefer" Äthernarkose. Bedeutung der einzelnen Kurven: *1.* Atmung (Pneumotachogramm, keine quantitative Eichung), *2.* arterielle Sauerstoffsättigung, *3.* Blutdruck, *4.* Atemminutenvolumen. 1. Lichtsignal: Beginn der Mangelatmung; 2. Lichtsignal: Beginn der Sauerstoffatmung; 3. Lichtsignal: Luftatmung. Versuch an Hund Otto; 15. 3. 55.

verständlich, wenn man berücksichtigt, daß bei den Untersuchungen am Menschen gewöhnlich eine Prämedikation (Morphium-Atropin, SEE usw.) vorangeht, und daß die Narkose nie so tief gehalten wird, wie es in unseren Versuchen der Fall war. Wurde auch beim Menschen ein sehr tiefes Narkosestadium erreicht, so fand sich ebenfalls eine Abnahme des Schlagvolumens (Pinotti[29], Bierhaus[5]).

Wie schon früher gezeigt [10] und an Hand der Abb. 3 und 4 demonstriert, bewirkt die Barbitursäurenarkose eine ähnliche Kreislaufumstellung, nur daß sich im Gegensatz zum Äther der Dämpfungsfaktor $E'/W$ nicht nennenswert ändert und der diastolische Druck etwas ansteigt.

Schon bei der Analyse der Kreislaufumstellung in Pernoctonnarkose [10, 23] hatte sich die Notwendigkeit ergeben, die Kreislaufveränderungen nicht nur isoliert, sondern vor allem im Zusammenhang mit den übrigen Reaktionen des Organismus auf das Narkoticum zu betrachten. Dabei konnten drei wesentliche Punkte herausgestellt werden:

I. Reduktion des Sauerstoffverbrauchs als Folge der maximalen Ruhigstellung des Organismus.

II. Lähmende Wirkung der Narkose auf die reflektorische Steuerung des Kreislaufs („Entzügelung").

III. Sekundäre Folgen der Atemdepression (Hypoxämie, Kohlensäureretention mit Acidose).

## I.

Während in Pernoctonnarkose die *Minimalwerte für den Sauerstoffverbrauch* mit den Minimalwerten bei optimaler Beruhigung des Tieres im pharmakologisch unbeeinflußten Zustand zusammenfallen [9], wurden unter Äther (Tab. 6 und Abb. 8) deutlich höhere Minimalwerte für den Sauerstoffverbrauch gefunden. Da wir in Äthernarkose nach dem Verhalten der somatischen Reflexe und dem Tonus der Muskulatur keinen Unterschied im Grad der Ruhigstellung der Skeletmuskulatur gegenüber Pernocton annehmen dürfen, muß die Ursache für das höhere Niveau des Sauerstoffverbrauchs unter Äther in der erhöhten Aktivität anderer Organe gesucht werden.

Wie bereits ausgeführt, bewirkt der Äther eine spezifische Steigerung der Atmung. Nach Kahlson und Peil[19] beträgt der Anteil der Atemarbeit am Gesamtsauerstoffverbrauch beim ruhig atmenden Hund 4—12%. Liljestrand[24] sowie E. A. Müller[27] fanden für den Menschen Werte von 1—3% bzw. 3,7—5,4%. Neuerdings hat Seusing[32] mit anderer Methodik für den Menschen mit 10—22% wesentlich höhere Werte für den Anteil der Atemarbeit am Ruheumsatz ermittelt. Der folgenden Überschlagsrechnung legen wir einen Wert von 10% zugrunde und setzen der Einfachheit halber eine lineare Beziehung zwischen Atemminutenvolumen und Atemarbeit voraus. Aus den Minimalwerten der Abb. 8 (bzw. Tab. 4) würde sich für Hund Erwin der Sauerstoffverbrauch der Atemmuskulatur zu 8,5 cm³ bei einem Atemvolumen von 1,8 Liter/min errechnen. Eine Steigerung des Atemvolumens auf 8,5 Liter/min unter Äther würde den Sauerstoffverbrauch der Atemmuskulatur auf 40 cm³/min und damit den Gesamtsauerstoffverbrauch auf (85—8,5) + 40 = 116,5 cm³/min erhöhen; gemessen wurden 125 cm³/min. Ebenso würde für Hund Otto die Steigerung des Atemvolumens von 2,4 auf 10,0 Liter/min den Gesamtsauerstoffverbrauch auf 105 cm³/min steigen lassen gegenüber einem gemessenen Wert von 110 cm³/min.

Diese Überschlagsrechnung zeigt, daß die *relativ hohen Sauerstoffverbrauchswerte* bzw. die Abweichungen vom Minimalumsatz, die nach unseren früheren Mitteilungen über den Einfluß der Narkose auf den Gesamtstoffwechsel [7, 9] überraschend erscheinen, durch die *Atemsteigerung befriedigend erklärt werden können*. Diese Auffassung gewinnt noch an Wahrscheinlichkeit, wenn man zwei bisher außer Acht gelassene Gesichtspunkte berücksichtigt: 1. Das von der Atemmuskulatur geförderte Volumen ist in Wirklichkeit größer als angegeben, weil das Volumen des Ätherdampfes zu dem mit der Gasuhr gemessenen Volumen hinzugezählt werden müßte; 2. der Atemwiderstand ist in Äthernarkose infolge der

vermehrten Bronchialsekretion sicherlich höher als beim unnarkotisierten Tier, so daß auch der Sauerstoffverbrauch je Liter Atemminutenvolumen unter Äther größer als in Ruhe sein wird. Eine quantitative Berücksichtigung dieser beiden Punkte müßte den Gesamtsauerstoffverbrauch sogar noch stärker über den Minimalumsatz erhöhen, als die Abb. 8 zeigt.

Die beim intakten, pharmakologisch unbeeinflußten Organismus in weiten Grenzen bestehende *Anpassung des Kreislaufs an den Energieumsatz* ist durch eine positive Korrelation zwischen Sauerstoffverbrauch und Herzminutenvolumen charakterisiert. Für die tiefe Pernoctonnarkose konnten wir sogar einen linearen Zusammenhang nachweisen, der jedoch bei Abflachung der Narkose wieder verloren ging, da das Minutenvolumen trotz des rasch anwachsenden Sauerstoffverbrauchs unter Anstieg der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz meist sehr viel langsamer folgte [10]. Als Ursache für dieses Verhalten wurde u. a. eine spezifische Einwirkung der Barbitursäure auf die Herzdynamik diskutiert. In tiefer Äthernarkose fand sich eine annähernd gleiche lineare Beziehung, jedoch entsprach den Werten gleichen Minutenvolumens unter Äther ein relativ höherer Sauerstoffverbrauch als in Pernoctonnarkose. Das Prinzip der Anpassung der Stromstärke an den Stoffwechsel des Organismus ist demnach auch bei der Äthernarkose gewahrt. Da diese Anpassung beim pharmakologisch unbeeinflußten Tier, in Barbiturat- und in Äthernarkose jedoch auf ganz verschiedene Art und Weise zustande kommt (siehe Einleitung), *reicht das Prinzip der Anpassung an den Sauerstoffverbrauch zur Erklärung der Kreislaufumstellung in Äthernarkose nicht aus; vielmehr müssen noch weitere Gesichtspunkte in Erwägung gezogen werden.*

## II.

Wie in sehr tiefer Barbituratnarkose war auch in sehr tiefer Äthernarkose der *Carotissinusreflex* erloschen. Diese Tatsache zusammen mit der exzessiven Steigerung der Herzfrequenz und der Abnahme der Amplitude legt den Gedanken nahe, daß auch beim Zustandekommen der Kreislaufveränderungen in Äthernarkose die Entzügelung maßgeblich beteiligt ist, wie dies für die Barbituratnarkose bereits ausführlich dargelegt wurde [22, 23].

Gegen diese Auffassung scheint im Falle der Äthernarkose die — wenn auch geringe — Abnahme von Mitteldruck, diastolischem Druck und peripherem Widerstand zu sprechen. Dieser Widerspruch findet jedoch eine Erklärung in der Wirkung des Äthers auf die Gefäßperipherie. Hierüber geben die unterschiedlichen Reaktionen auf Adrenalin im Stadium des erloschenen Carotissinusreflexes Aufschluß (Abb. 6). Wie bereits geschildert, bewirkt 0,1 $\gamma$/kg Adrenalin in Pernoctonnarkose einen starken

primären Anstieg mit nachfolgendem tiefen Abfall des Blutdrucks, wohingegen in Äthernarkose praktisch kein initialer Blutdruckanstieg zu beobachten und die sekundäre Depression nur geringgradig ausgeprägt ist. Diese Tatsache in Verbindung mit dem relativ niederen peripheren Widerstand in Äthernarkose (Abb. 4) ist unseres Erachtens nur dadurch zu erklären, daß Äther zu einer peripheren Dilatation der Gefäße führt, gegen die sich die constrictorische Wirkung des Adrenalins nicht durchzusetzen vermag. Für diese Auffassung sprechen auch die Untersuchungen von Mennicke[26], der am Gefäßpräparat nach Anwendung einer 0,1—3,8%igen Ätherlösung eine Gefäßerweiterung gefunden hat. Das in Barbituratnarkose voll ausgeprägte Bild der Entzügelung wird demnach in Äthernarkose durch die periphere Gefäßwirkung des Äthers maskiert. Dennoch besteht — schon wegen des Ausfalls des Carotissinusreflexes — kein Zweifel daran, daß die *Entzügelung eine wesentliche Ursache der Kreislaufumstellung auch in Äthernarkose darstellt.*

Über die bisherigen Betrachtungen hinaus gibt die Analyse des wiederkehrenden Carotissinusreflexes weiteren Aufschluß über den Mechanismus der Kreislaufumstellung in Narkose. Eine solche Analyse läßt sich nach Wagner[36] und Drischel[12] am besten in Analogie zur Analyse technischer Regelvorgänge durchführen. Die nach einseitiger Abklemmung einer Carotis einsetzende Blutdrucksteigerung wirkt beim Lösen der Abklemmung als stoßförmige Störung; die nachfolgende Blutdruckkurve läßt sich demnach formal als Übergangsfunktion beschreiben. Die drei oben geschilderten Reaktionstypen (Abb. 5), zu denen wir noch den Zustand des völlig erloschenen Reflexes hinzufügen, ließen sich danach etwa folgendermaßen deuten:

1. Der *Normaltyp.* Der steile Blutdruckabfall nach dem Lösen der Abklemmung läßt sich als das Verhalten eines Regelsystems 2. Ordnung erklären, dessen Dämpfungsverhältnis bei stoßförmigen Störungen den Einschwingungsvorgang des sog. aperiodischen Grenzfalls verwirklicht. Die Regelgüte ist optimal.

2. Der *Barbiturattyp.* Die charakteristische negative Blutdruckschwankung beim Lösen der Abklemmung entspricht dem Verhalten eines Regelsystems 2. Ordnung, dessen Dämpfungsverhältnis zu periodisch gedämpften Einschwingungsvorgängen führt mit entsprechend herabgesetzter Regelgüte — „periodische Entartung" (Drischel[12]). Als Ursache käme ein Fortfall dämpfender Einflüsse übergeordneter Glieder des Zentralnervensystems in Frage.

3. Der *Äthertyp.* Die überaus träge Blutdruckreaktion läßt auf ein Regelsystem 2. Ordnung mit einem Dämpfungsverhältnis schließen, das zu einer „aperiodischen Entartung" (Drischel[12]) mit stark verminderter Regelgüte führt. Als Ursache ist die Funktionsbehinderung des einen wesentlichen Stellgliedes „Gefäßperipherie" anzunehmen.

4. Die *vollständige Entzügelung.* Die Herzfrequenz erreicht einen oberen Grenzwert (Wagner[36]). Schwankungen der Regelgröße werden nicht mehr an den Stellgliedern wirksam. Es muß eine erhebliche Funktionsstörung im Eingang des Regelkreises (Pressoreceptoren bzw. deren zentrale Synapsen) angenommen werden.

Der betrachtete Blutdruckregelkreis läßt sich also in Übereinstimmung mit Wagner[36] und Drischel[12] als ein System 2. Ordnung auffassen, dessen verschiedenes Verhalten unter Pernocton- und Äthernarkose zwanglos auf Änderungen des Dämpfungsverhältnisses zurückgeführt werden kann. Die aus der Adrenalinreaktion gefolgerte peripher lähmende Wirkung des Äthers gewinnt auch durch diese Analyse der Reaktionstypen bei Carotissinusentlastung an Wahrscheinlichkeit.

Die im Normalfall in weiten Grenzen bestehende Koppelung zwischen Blutdruckreaktion und Herzfrequenz (Eb. Koch[21], Wagner[36]) ist in Narkose allerdings nicht mehr gewahrt, wie das Persistieren der Herzfrequenzsteigerung trotz Wiederkehr des Carotissinusreflexes in allen Ätherversuchen und in einigen Pernoctonversuchen (Abb. 5) beweist. Offenbar wirken noch andere Faktoren über zum Teil noch unbekannte Schaltstellen auf die Regulierung der Herzfrequenz ein. Wie bei der Atmung ist möglicherweise auch bei der Herzfrequenzsteigerung an einen zusätzlichen, zentral analeptischen Einfluß des Äthers zu denken.

## III.

Andererseits müssen als Ursache für die Herzfrequenzsteigerung, wie es bereits an anderer Stelle für die Barbitursäurenarkose geschehen ist [23], die *sekundären Folgen der Atemwirkung* des Narkoticum diskutiert werden. Da in Äthernarkose keine Atemdepression, sondern im Gegenteil eine beträchtliche Atemsteigerung besteht, kann eine durch Kohlensäurerentention bedingte Acidose als ursächliches Moment der Kreislaufveränderungen ausgeschlossen werden. Dagegen muß an die Möglichkeit einer Kreislaufbeeinflussung durch *Hypoxämie* gedacht werden, die wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren [20, 31] in tiefer Äthernarkose gefunden haben. Von den meisten Untersuchern wird die Ursache für die Hypoxämie in einer Erschwerung der Sauerstoffdiffusion gesehen. Der steile Anstieg der arteriellen Sauerstoffsättigung nach reiner Sauerstoffatmung (Abb. 9) scheint uns jedoch gegen diese Annahme zu sprechen [1, 13, 25]. Wir halten es bei der von uns gewählten Narkosetechnik vielmehr für wahrscheinlicher, daß in unseren Versuchen infolge der hohen Ätherdampfkonzentration die damit verbundene relativ starke Senkung des Sauerstoffpartialdruckes in der Atemluft zu der Hypoxämie geführt hat. Daß diese Hypoxämie in Äthernarkose tatsächlich eine Kreislaufwirkung ausübt, wird durch die in den Ergebnissen geschilderte Abnahme der Herzfrequenz bei reiner Sauerstoffatmung belegt. *Ähnlich wie in Barbituratnarkose kann demnach die Hypoxämie jedenfalls für einen Teil der Kreislaufveränderungen in Äthernarkose verantwortlich gemacht werden*; dies um so mehr, als die Hypoxämie nach Gordh[14], Heymans[16], Nowack und Samaan[28] den Kreislauf ebenfalls im Sinne einer Entzügelung beeinflussen kann.

IV.

Zusammenfassend ergibt sich: *Die für das Zustandekommen der Kreislaufumstellung in Barbituratnarkose als wirksam erkannten Faktoren gelten in gleicher Weise auch für die reine Äthernarkose, nämlich 1. Anpassung der Stromstärke an den Sauerstoffverbrauch, 2. Entzügelung und 3. Hypoxämie. Unterschiede ergeben sich 1. durch die peripher dilatierende und 2. durch die zentral analeptische Wirkung des Äthers.*

## Zusammenfassung.

1. In 214 Versuchen, 120 Wach- und 94 Narkoseversuchen, an Hunden mit doppelseitigen Carotisschlingen wurden Kreislauf, Atmung und respiratorischer Stoffwechsel untersucht und die Wirkung der Äthernarkose mit derjenigen der Pernoctonnarkose verglichen.

2. Die in Äthernarkose beobachteten charakteristischen Veränderungen der einzelnen *Kreislaufgrößen*, bezogen auf die Werte im optimalen Ruhezustand, bestanden in einer extremen Steigerung der Herzfrequenz, einer geringen Abnahme des Mitteldruckes, einer starken Abnahme von Blutdruckamplitude und Schlagvolumen bei geringer Zunahme des Minutenvolumens, einer beträchtlichen Zunahme des elastischen und einer geringen Abnahme des peripheren Widerstandes mit einem entsprechenden Anstieg des Dämpfungsfaktors $E'/W$.

3. Die Prüfung der *Kreilaufreaktivität* ergab in „sehr tiefer" Äthernarkose einen Ausfall des Carotissinusentlastungsreflexes und in „tiefer" Äthernarkose eine charakteristische Abweichung der Blutdruckreaktion vom Normalverhalten. Ebenso trat auf Adrenalin in kleinen Dosen eine gegenüber der Norm und gegenüber der Pernoctonnarkose veränderte Reaktion ein. Beatmung mit 4 und 8% Kohlensäure in Luft hatte keine Kreislaufreaktion zur Folge. Beatmung mit reinem Sauerstoff führte zu einer geringen Senkung der Herzfrequenz.

4. *Atemminutenvolumen* und *Atemfrequenz* waren in allen Stadien der Äthernarkose gesteigert. Die trotzdem beobachtete leichte Hypoxämie wurde auf die hohen Ätherdampfkonzentrationen in der Atemluft zurückgeführt. Beatmung mit 4 und 8% Kohlensäure oder reinem Sauerstoff hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Atmung.

5. Der *Sauerstoffverbrauch* war in Äthernarkose gegenüber den Minimalwerten im Wachzustand und in Pernoctonnarkose erhöht. Diese Erhöhung konnte quantitativ mit der vermehrten Atemarbeit erklärt werden.

6. Trotz der bestehenden Unterschiede im Verhalten einiger Kreislaufgrößen in Äther- und Barbituratnarkose konnte die Kreislaufumstellung bei beiden Narkosearten auf die gleichen Faktoren zurückgeführt werden, nämlich a) Anpassung der Stromstärke an den Sauerstoffverbrauch,

b) Entzügelung und c) Hypoxämie. Die bestehenden Unterschiede ließen sich durch spezifische Wirkungen des Äthers auf die Gefäßperipherie und auf das Zentralnervensystem erklären.

## Literatur.

[1] Albers, C., u. W. Brendel: Pflügers Arch. **260**, 345 (1955). — [2] Albers, C., u. W. Brendel: Verh. dtsch. Ges. Physiol. 1954. — [3] L'Allemand, H., u. W. Brendel: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **60**, 166 (1954). — [4] L'Allemand, H., W. Brendel u. W. Usinger: Anaesthesist **4**, 36 (1955). — [5] Bierhaus, H.: Chirurgie und Kreislauf. Stuttgart: Wissenschaft. Verlagsges. 1949. — [6] Brendel, W., u. H. L'Allemand: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 87 (1955). — [7] Brendel, W., u. E. Koppermann: Verh. dtsch. Ges. Physiol. 1953. — [8] Brendel, W., u. E. Koppermann: Pflügers Arch. **258**, 121 (1953). — [9] Brendel, W., E. Koppermann u. R. Thauer: Pflügers Arch. **259**, 177 (1954). — [10] Brendel, W., E. Koppermann u. R. Thauer: Pflügers Arch. **259**, 357 (1954). — [11] Buhr, G.: Anaesthesist **1**, 85 (1952). — [12] Drischel, H.: Wissenschaft. Z. D. Univ. Greifswald II, Nr. 2 (1952/53). — [13] Gilmore, H. R., M. Hamilton, H. Kopelman and L. Sommer: Brit. Heart J. **16**, 301 (1954). — [14] Gord, Th.: Acta chir. scand. (Stockh.) **92**, Suppl. 102 (1945). — [15] Heymans, C.: Le Sinus Carotidien. Paris: C. Doin & Cie. 1933. — [16] Heymans, C.: The Regulation of Blood Pressure and Heart Rate. Springfield, Illinois: C. C. Thomas 1950. — [17] Kärber, G.: Arch exper. Path. u. Pharmakol. **160**, 428 (1931). — [18] Kärber, G., u. L. Lendle: Arch exper. Path. u. Pharmakol. **160**, 440 (1931). — [19] Kahlson, G., u. M. Peil: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **78**, 117 (1938). — [20] Kilian, H.: Die Narkose. Stuttgart: Thieme 1954. — [21] Koch, Eb.: Die reflektorische Selbststeuerung des Kreislaufs. Dresden: Steinkopff 1931. — [22] Koppermann, E., u. W. Brendel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 166 (1954). — [23] Koppermann, E., W. Brendel u. R. Thauer: Pflügers Arch. **260**, 239 (1955). — [24] Liljestrand, G.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **35**, 199 (1918). — [25] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart: Thieme 1954. — [26] Mennicke: zit. nach Kilian[20]. — [27] Müller, E. A., H. Michaelis u. A. Müller: Arbeitsphysiologie **112**, 193 (1942). — [28] Nowack, J. G., u. A. Samaan: Arch. internat. Pharmacodynamie **51**, 463 (1935). — [29] Pinotti: zit. nach Kilian[20]. — [30] Polano, F.: Dtsch. Z. Chir. **239**, 505 (1933). — [31] Rühl, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **158**, 282 (1930). — [32] Seusing, J.: Dtsch. Arch. klin. Med. **201**, 395 (1954). — [33] Schroeder, W.: Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). — [34] Schroeder, W.: Z. exper. Med. **117**, 181 (1951). — [35] Thauer, R., u. K. Wezler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 84 (1942). — [36] Wagner, R.: Probleme und Beispiele biologischer Regelung. Stuttgart: Thieme 1954. — [37] Wezler, K., u. A. Böger: Arch. exper. Path u. Pharmakol. **184**, 482 (1937).

Dr. Claus Albers, Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 301—318 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke).

# Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Azetylcholin*.

Von
O. Kraupp, G. Werner, W. Kobinger und H. Stormann.

Mit 3 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 2. Mai 1955.)*

## 1. Theoretische Vorbemerkungen.

Ein Zusammenhang zwischen Erniedrigung von Membranpotentialen und gleichzeitiger Verschiebung der Ionenkonzentrationen zu beiden Seiten der Membran ist durch das Vorliegen von Donnangleichgewichten gegeben[2]; im speziellen Fall der Muskelmembranen stimmen Größe und Richtung des Membranpotentials im wesentlichen mit den aus dem Konzentrationsverhältnis von intra- zu extracellulären Kaliumionen zu errechnenden Werten überein[21]. Jede Erniedrigung des Membranpotentials muß daher mit einem Übertritt von Kaliumionen in der Richtung des Konzentrationsgradienten verbunden sein.

Tatsächlich wurde unter Bedingungen, unter denen eine Erniedrigung des Membranpotentials herbeigeführt wurde, ein Austritt von intercellulärem Kalium beobachtet. Hardt und Fleckenstein[19] konnten zeigen, daß am Froschmuskel nach Einwirkung verschiedener Kontrakturstoffe zugleich mit einer Erniedrigung des Ruhepotentials ein Übertritt von intracellulärem Kalium in die Badeflüssigkeit stattfindet. Für eine Reihe neuromuskulär wirksamer quartärer Ammoniumsalze (Succinylbischolin, Dekamethonium und Octamethylen-biscarbaminoylcholin), die eine vorübergehende Depolarisation der Endplattenregion bewirken, wurde ebenfalls eine analytisch meßbare Freisetzung von Kaliumionen aus der Muskulatur bei intravenöser Zufuhr an Hunden bzw. bei Zusatz zur Durchströmungsflüssigkeit isolierter hinterer Katzenextremitäten nachgewiesen[22]. Auch nach tetanischer elektrischer Reizung von Froschmuskeln bis zur Ermüdung konnte eine Abgabe von Kaliumionen an die Ringer-Lösung beobachtet werden[28, 30]. Bei diesen Versuchen ist allerdings nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob die Freisetzung von Kalium dem Kontraktionsvorgang als solchem oder der depolarisierenden Wirkung der Überträgersubstanz Acetylcholin (ACh) zuzuschreiben ist. Versuche von Somogyi und Verzar[31] mit intraarterieller Injektion von ACh an Katzen sowie Untersuchungen von Hardt und Fleckenstein[19] und Fenn, Gerschmann, Fischer, Lacy, Bailly und Wright[17] an Froschmuskeln deuten hingegen darauf hin, daß ACh direkt zu einer meßbaren Freisetzung von Kaliumionen führen kann. Ein derartiger Effekt wäre auf Grund der bekannten depolarisierenden Wirkung des ACh auf die Skeletmuskulatur von Kaltblütern[9, 13, 29] und Warmblütern[4] zu erwarten.

* Diese Arbeit ist dem Andenken an Professor Dr. R. Rössler anläßlich seines 10. Todestages gewidmet.

Entsprechend der erheblich größeren Empfindlichkeit der Membran der motorischen Endplatte (Ep) für ACh ist anzunehmen, daß zumindest in einem gewissen Konzentrationsbereich ein Austritt von Kaliumionen nur an dieser Stelle der Muskelmembran erfolgt. Über das Ausmaß der unter der Einwirkung von ACh zu erwartenden Freisetzung von Kaliumionen sind zunächst prinzipiell zwei verschiedene Annahmen möglich: 1. Die Kurzschlußhypothese des Endplattenpotentials (Epp) von Fatt und Katz[15]; nach dieser Hypothese bewirkt die neuromuskuläre Überträgersubstanz ACh gleichzeitig mit der Anstiegsphase des Epp eine Erhöhung der Membranpermeabilität für alle, zumindest aber für mehrere verschiedene Ionenarten; der dadurch entstehende Ionenfluß entspricht an der nicht curarisierten motorischen Endplatte einem Ladungstransport von $2—3 \cdot 10^{-9}$ Coulomb. Im Zustand der maximalen Depolarisation ist dann das Potential der Ep-Membran durch die Höhe des Diffusionspotentials zwischen Myoplasma und Extracellulärflüssigkeit bestimmt. 2. Komplizierter gestalten sich die Verhältnisse, wenn mit einer Abhängigkeit des Membranpotentials der Ep von den einwirkenden Konzentrationen der depolarisierenden Substanz zu rechnen ist; tatsächlich scheinen Beobachtungen von del Castillo und Katz[5] auf die Möglichkeit einer solchen Abhängigkeit des Potentials der Ep-Membran von der ACh-Konzentration hinzuweisen. Für die Möglichkeit partieller Depolarisation spricht auch die Existenz von Epp „en miniature".[6] Unter derartigen Bedingungen kann der Ionenfluß mittels der auf Grund der Theorie von Goldman[18] entwickelten Gleichungen abgeschätzt werden. Fatt hat unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse den Kaliumausstrom aus Froschmuskeln unter Einwirkung von ACh berechnet.[13]

Die in der vorliegenden Mitteilung beschriebenen Versuchsergebnisse sollen zeigen, unter welchen Bedingungen und in welcher Größenordnung eine Freisetzung von Kalium aus der Skeletmuskulatur unter der Einwirkung von ACh erfolgt, wobei zum Vergleich auch die Verhältnisse am chronisch denervierten Muskel beschrieben werden. Es kam uns dabei besonders darauf an, aus dem zeitlichen Verlauf sowie aus der Dosisabhängigkeit der Kaliumausschüttung und aus dem unterschiedlichen Verhalten von innerviertem und denerviertem Muskel Beobachtungen zu gewinnen, die in Hinblick auf die eingangs dargestellten Theorien von Interesse sein können.

## 2. Experimenteller Teil.

### *a) Methodik*

Die Versuche wurden an Katzen durchgeführt. Die hinteren Extremitäten wurden durch eine in die Aorta eingebundene Kanüle aus einem Vorratsgefäß mit einem Blut-Tyrode-Gemisch (Blut eines heparinisierten Spendertieres mit Tyrodelösung im Verhältnis 1 : 5 verdünnt; durchschnittliche Sauerstoffkapazität 3,5 bis 4,0 Vol.%) isoliert durchströmt. Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung:

149 mM/l Na, 4,1 mM/l K, 1,8 mM/l Ca, 0,26 mM/l Mg, 144,3 mM/l Cl, 10,4 mM/l $HCO_3$, 0,4 mM/l $H_2PO_4$, 8,35 mM/l Glucose. Die Blut-Tyrodelösung wurde mittels eines Gasgemisches, bestehend aus 95% $O_2$ und 5% $CO_2$ durchperlt. Der venöse Ausfluß wurde aus beiden Venae iliacae getrennt abgeleitet, in Perioden von je 2—4 min Dauer gesammelt, das Durchflußvolumen gemessen, sofort zentrifugiert und in der überstehenden Flüssigkeit nach entsprechender Verdünnung der Kaliumgehalt flammenphotometrisch (Flammenphotometer Dr. B. Lange, Modell 3) bestimmt. Die durchströmten Extremitäten waren in einem Wasserbad mit konstanter Temperatur von 36° C versenkt, in dem auch die zufließende Durchströmungsflüssigkeit vorgewärmt wurde. Die Injektion von ACh (als Bromid) erfolgte in den zuführenden Schlauch unmittelbar vor der Aortenkanüle; das Injektionsvolumen betrug bei allen Dosen 1 ml. Da sich die in die Aorta injizierten ACh-Gesamtdosen im Verhältnis der Durchflußgrößen auf die beiden Extremitäten aufteilten, wurden die in den folgenden Versuchen angegebenen ACh-Dosen für jede Extremität aus der Gesamtdosis und dem Durchflußverhältnis errechnet.

An jedem Tier war, wenn nicht anders angegeben, eine Extremität 8 bis 12 Tage vor dem Versuch aseptisch durch Durchschneidung der Nn. ischiadicus und femoralis denerviert worden.

### *b) Vorversuche über die Spontanfreisetzung von Kaliumionen aus der Muskulatur isoliert durchströmter hinterer Extremitäten.*

Für eine quantitative Bestimmung des spezifisch durch ACh in Freiheit gesetzten Kaliums war es zunächst notwendig, solche Versuchsbedingungen zu schaffen, unter denen eine möglichst geringe und zeitlich konstante Spontanfreisetzung von Kaliumionen aus der Muskulatur erfolgte.

Aus den bisher in der Literatur mitgeteilten Ergebnissen geht hervor, daß unter anderem durch ungenügende Sauerstoffversorgung sowohl am Kaltblüter-[16] als auch am Warmblütermuskel[11, 25] ein vermehrter Übertritt von Kaliumionen in die Extracellulärflüssigkeit hervorgerufen wird. Sauerstoffbindungsvermögen und Durchströmungsgeschwindigkeit wurden deshalb so gewählt, daß der Sauerstoffbedarf der isoliert durchströmten Hinterextremität gedeckt war; für diesen wurde ein Wert von $5 \cdot 10^{-3}$ ml $O_2$/sec/100 g Muskelgewebe angegeben[27]. Bei den verwendeten Durchflußgrößen von 15 bis 25 ml/min/Extremität mußte daher zur Aufrechterhaltung der oben angegebenen Sauerstoffzufuhr eine Sauerstoffkapazität von 3,5 bis 4,0 Vol.% in der Durchströmungsflüssigkeit eingehalten werden.

Unter diesen Bedingungen konnte tatsächlich die Spontanfreisetzung von Kaliumionen aus der Muskulatur auf Werte von 1—2 $\mu M$/min für die innervierte, bzw. 2—4 $\mu$M/min für die denervierte Extremität reduziert werden; sie blieb außerdem über längere Versuchsperioden konstant und hielt die angegebenen Werte selbst bei Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit bis auf 30 ml/min/Extremität bei.

In den nachstehend mitgeteilten Versuchsergebnissen über die Freisetzung von Kaliumionen nach ACh Zufuhr wurden nur solche Versuche berücksichtigt, die diese Bedingungen erfüllten.

### *c) Kaliumfreisetzung durch Azetylcholin.*

Die an 10 Versuchstieren erhaltenen Ergebnisse lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. An der innervierten Extremität trat eine deutlich nachweisbare Erhöhung der Kaliumfreisetzung gegenüber den Werten der Kontrollperioden erst ab Dosen von 0,8—0,9 $\mu$M (180—205 $\mu$g) ACh auf; das Ausmaß dieser zusätzlichen Kaliumfreisetzung nahm mit steigender Dosis zu und wurde bis zu einer Dosis von 250 $\mu$M (56,5 mg) ACh bestimmt.

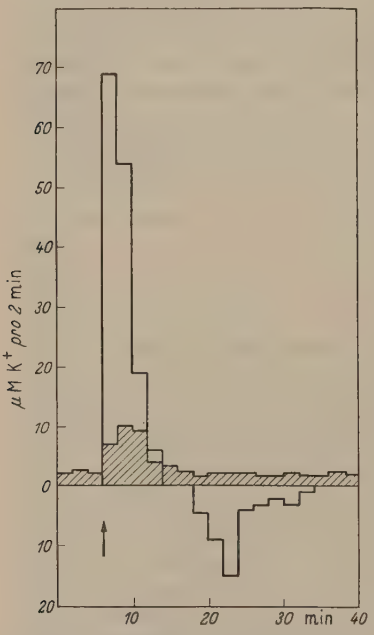



Abb. 1. Kaliumfreisetzung aus der innervierten und denervierten Muskulatur der hinteren Extremität einer Katze nach einer einmaligen intraarteriellen Injektion von 28,7 $\mu$M ACh (12,8 $\mu$M: Innervierte E., 15,9 $\mu$M: Denervierte E.). Ordinate: Kaliumabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in$\mu$ M/2 min (AV Differenz × Durchflußvolumen). Abscisse: Zeit in Minuten. Bei ↑ ACh-Injektion. Leer umrandete Felder: Ausschüttung aus der denervierten, schraffierte Felder: Ausschüttung aus der innervierten Muskulatur.

2. Bei einem Zeitintervall von 3—4 Tagen zwischen Denervierung und Versuch konnte an der denervierten Extremität hinsichtlich der Kaliumfreisetzung kein unterschiedliches Verhalten gegenüber der innervierten Extremität festgestellt werden. Nach Denervationszeiten von 8 bis 11 Tagen (8 Versuche) bestand jedoch ein erheblicher Unterschied in der Grenzdosis von ACh, da bereits bei einer Dosis von 0,02 $\mu$M (4,5 $\mu$g) ACh eine deutlich nachweisbare zusätzliche Kaliumfreisetzung auftrat.

Der Unterschied in der Menge des freigesetzten Kaliums sowie der zeitliche Ablauf der Kaliumausscheidung an der denervierten und innervierten Extremität können zunächst an Hand des in Abb. 1 wiedergegebenen typischen Versuches ersehen werden.

Die zusätzliche Kaliumausscheidung nach ACh zeigte in allen Versuchen folgende charakteristische Merkmale: Bereits in der der Injektion unmittelbar folgenden Sammelperiode trat bei Dosen oberhalb der Grenzdosis eine vermehrte Kaliumausscheidung auf, die entweder in dieser oder in der nächstfolgenden Sammelperiode ihr Maximum erreichte und je nach der Größe der Dosis innerhalb von 6—14 min wieder auf den Ausgangswert der Spontanfreisetzung zurückkehrte. Bei höheren Dosen konnte vor allem an der denervierten Extremität anschließend an die Ausschüttungsperiode eine vorübergehend negative arteriovenöse Konzentrationsdifferenz als Zeichen eines Eintrittes von Kalium in die Muskulatur beobachtet werden. Infolge des verhältnismäßig rasch erfolgenden Abklingens der Kaliumfreisetzung nach Einzelinjektionen von ACh zu den Werten der Kontrollperioden war es mög-

lich, mehrere Dosen von ACh in jedem Versuch zu verabreichen; in Kontrollversuchen war vorher festgestellt worden, daß bei mehrmaliger Verabreichung derselben Dosis an einem Präparat annähernd gleiche Kaliummengen zur Ausschüttung gelangen. Dementsprechend wurden in der Mehrzahl der Versuche 3 bis 4 Dosen injiziert und zur quantitativen Auswertung als brauchbar befunden.

Die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen injiziertem ACh und Mehrausschüttung an Kaliumionen wurde in der folgenden Weise quantitativ bestimmt und einer statistischen Prüfung unterzogen: zur Berechnung der zusätzlich durch die verabreichte ACh-Dosis in Freiheit gesetzten Kaliummenge wurden zunächst die Differenzen zwischen den Kaliumkonzentrationen der jeweiligen Sammelperioden und den Konzentrationen der Kontrollperioden vor und nach der Injektion bestimmt. Diese Konzentrationsdifferenzen wurden mit dem Durchflußvolumen der zugehörigen Sammelperiode multipliziert, summiert und stellen die in Tab. 1 (Spalte 4 bzw. 8) angegebenen Werte in $\mu$M dar. In den Tabellen sind nur solche Werte angegeben, bei denen nach Abklingen des ACh-Effektes im Verlaufe von maximal 15 min die anfängliche Spontanausschüttung wieder erreicht wurde.

Die unter diesen Bedingungen ermittelten Kaliumausschüttungen wurden in Abb. 2 in linearem Maßstab auf der Ordinate und die dazugehörigen Dosen im logarithmischen Maßstab auf der Abszisse aufgetragen. Die statistische Auswertung der in Abb. 2 eingetragenen Punktescharen erfolgte in der Weise, daß zunächst nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die Polynome ersten bis dritten Grades für die kurvenmäßige Darstellung der Meßpunkte ermittelt wurden. Die Summe der Abweichungsquadrate von den aus den Gleichungen der Polynome errechneten und den experimentell gefundenen Punkten war bei allen drei Polynomen von der gleichen Größenordnung. Da somit die Einführung von Gliedern höherer Potenzen keine Verbesserung der Anpassung der Kurven an die Meßpunkte bewirkte, wurde den weiteren Betrachtungen der lineare Kurvenverlauf zugrunde gelegt. Die Gleichungen der beiden Geraden lauten:

a) innervierte Extremität: $y = -132{,}56 + 41{,}66\,x$ [1] (I)
$s = 17{,}071$
$r = 0{,}85$

b) denervierte Extremität: $y = -66{,}90 + 54{,}03\,x$ (II)
$s = 34{,}377$
$r = 0{,}89$

In diesen Gleichungen bedeuten: $y$ die Kaliumfreisetzung in $\mu$M, $x$ den Logarithmus der ACh-Dosis in $\mu$M, $s$ die mittlere quadratische Abweichung und $z$ den Korrelationskoeffizienten.

*Tabelle 1.*

| Vers. Nr. | Den. Zeit in Tagen | innerviert | | | | denerviert | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ACh-Dos. in $\mu$M | K-Ausscheidung in $\mu$M | Fluß in cm³/min | log. Dos. ACh | ACh-Dos. in $\mu$M | K-Ausscheidung in $\mu$M | Fluß in cm³/min | log Dos. ACh. |
| KK 4 | 9 | 5,54 | 17,0 | 16,7 | 0,732 | 5,54 | 130,3 | 16,5 | 0,732 |
| KK 6 | 8 | 4,62 | 11,8 | 7,0 | 0,664 | 6,46 | 103,3 | 12,6 | 0,810 |
| KK 7 | 11 | 3,90 | 11,0 | 12,3 | 0,591 | 7,18 | 115,4 | 20,2 | 0,856 |
| KK 7 | 11 | 0,84 | 3,2 | 12,7 | 0,924—1 | 1,37 | 80,0 | 21,5 | 0,136 |
| KK 7 | 11 | 8,60 | 30,9 | 11,0 | 0,934 | 13,45 | 101,9 | 17,3 | 1,127 |
| KK 8 | 9 | 0,15 | 0 | 14,9 | 0,176—1 | 0,106 | 49,2 | 13,4 | 0,025—1 |
| KK 8 | 9 | 0,59 | 0 | 16,0 | 0,770—1 | 0,520 | 76,0 | 13,6 | 0,717—1 |
| KK 8 | 9 | 23,60 | 49,1 | 16,0 | 1,372 | 20,3 | 196,7 | 13,1 | 1,307 |
| KK 8 | 9 | 12,5 | 27,3 | 15,8 | 1,096 | 10,75 | 143,2 | 14,0 | 1,029 |
| KK 9 | 8 | 0,024 | 0 | 15,0 | 0,380—2 | 0,02 | 14,0 | 12,4 | 0,301—2 |
| KK 9 | 8 | 0,012 | 0 | 16,5 | 0,079—2 | 0,009 | 0 | 12,0 | 0,954—3 |
| KK 9 | 8 | 0,053 | 0 | 15,0 | 0,724—2 | 0,035 | 25,9 | 11,0 | 0,544—2 |
| KK 9 | 8 | 0,24 | 0 | 17,0 | 0,380—1 | 0,199 | 35,9 | 13,5 | 0,299—1 |
| KK 9 | 8 | 51,0 | 83,7 | 16,5 | 1,707 | 37,60 | 194,3 | 11,2 | 1,575 |
| KK 10 | 11 | 18,2 | 45,4 | 19,5 | 1,260 | 25,8 | 270,3 | 29,5 | 1,411 |
| KK 10 | 11 | 11,4 | 18,0 | 16,0 | 1,056 | 16,1 | 177,4 | 20,0 | 1,206 |
| KK 10 | 11 | 17,4 | 25,2 | 12,5 | 1,240 | 15,6 | 102,0 | 15,5 | 1,193 |
| KK 10 | 11 | 250,0 | 125,3 | 12,5 | 2,397 | — | — | — | — |
| KK 10 | 11 | — | — | — | — | 30,5 | 239,2 | 14,0 | 1,484 |
| KK 19 | 9 | 0,02 | 0 | 25,0 | 0,301—2 | 0,024 | 18,4 | 32,0 | 0,380—2 |
| KK 19 | 9 | 0,038 | 0 | 28,0 | 0,579—2 | 0,048 | 25,0 | 30,8 | 0,681—2 |
| KK 19 | 9 | 0,43 | 0 | 27,3 | 0,633—1 | 0,455 | 67,7 | 28,0 | 0,658—1 |
| KK 19 | 9 | 44,2 | 35,9 | 29,5 | 1,645 | 44,2 | 160,1 | 29,3 | 1,645 |
| KK 18 | 11 | 12,8 | 24,0 | 19,0 | 1,107 | 15,9 | 149,0 | 25,7 | 1,201 |
| KK 3 | 4 | 0,51 | 0 | 24,0 | 0,707—1 | 0,73 | 0 | 27,0 | 0,863—1 |
| KK 3 | 4 | 2,8 | 14,0 | 23,0 | 0,447 | 3,1 | 13,0 | 25,0 | 0,491 |
| KK 5 | 3 | 5,54 | 41,3 | 15,0 | 0,732 | 5,54 | 34,4 | 14,0 | 0,732 |

Zunächst wurde nun geprüft, ob der Unterschied in den Grenzdosen von ACh für die Kaliumausschüttung an der innervierten und denervierten Extremität statistisch signifikant ist bzw. ob die beobachteten Kaliumausschüttungen der beiden Extremitäten im gesamten untersuchten Dosenbereich signifikant voneinander abweichen. Die An-

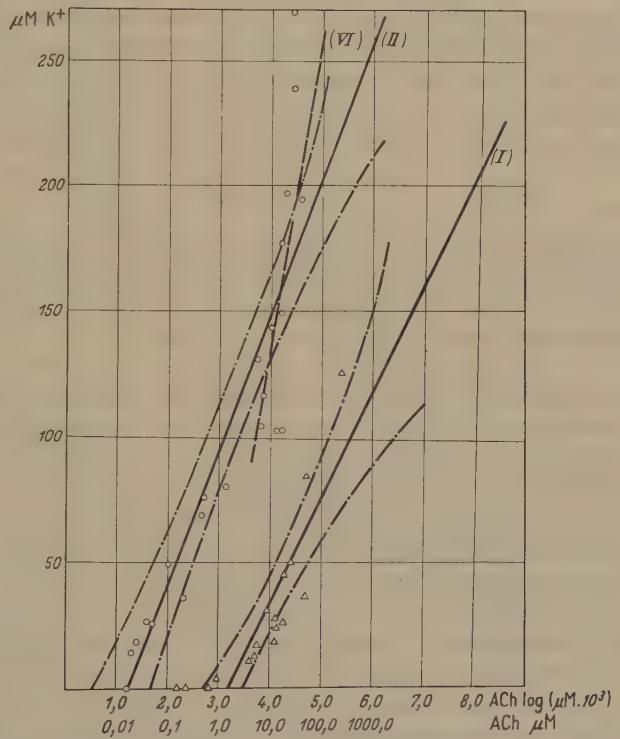



Abb. 2. Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch ACh an der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur. Innervierte Muskulatur: (I), denervierte Muskulatur: (II). Die strichpunktierten Geraden geben die Begrenzung der Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Dosenlogarithmen von ACh, die gleicher Kaliumausschüttung zuzuordnen sind, an. Ordinate: µM Kaliumionen. Abscisse: Logarithmen der ACh-Dosen in µM. Der Nullpunkt des Abscissenmaßstabes wurde zur Vereinfachung der statistischen Rechnungen bei log ACh $10^{-9}$ Mol angenommen.

wendung der statistischen Formeln wurde unter Mithilfe von Herrn Dozent Dr. W. Knödel vom mathematischen Labor der Technischen Hochschule Wien durchgeführt. Wir danken an dieser Stelle für die wertvollen Hinweise und Ratschläge. Zu diesem Zwecke wurden für die Geraden (I) und (II) die Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Logarithmen der ACh-Dosen nach der folgenden Formel bestimmt[10]:

$$Y = \alpha^* + \beta^* (X - \bar{x}) \pm t_p \frac{\sigma^*}{\sqrt{n-2}} \sqrt{1 + \left(\frac{X - \bar{x}}{S_1}\right)^2}. \qquad \text{(III)}$$

Die Ausdrücke $\alpha^*$ und $\beta^*$ sind mit den Ordinatenabschnitten (a) und den Steigungen (b) der Gleichungen (I) und (II) durch die folgende Beziehung verbunden:

$$a + b \cdot X = \alpha^* + \beta^* (X - \bar{x}),$$

wobei $\bar{x}$ den Mittelwert der Logarithmen der den Geraden (I) bzw. (II) zugrunde liegenden ACh-Dosen und X die neue laufende Abszisse im selben Maßsystem darstellen; $A_p$ entspricht den $t$-Werten nach R. A. Fisher für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5% und $n - 2$ Freiheitsgraden, wobei $n$ die Zahl der experimentellen Wertepaare bedeutet. Der Ausdruck $\sigma^*$ ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$(\sigma^*)^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} [y_i - \alpha^* - \beta^* (x_i - \bar{x})]^2. \qquad \text{(IV)}$$

In Gleichung (IV) bedeuten $x_1$ und $y_1$ die einander zugehörigen Werte der Dosenlogarithmen und Kaliumausschüttung (Tab. 1); $S_1$ bedeutet in der üblichen Weise: $S_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2$.

Für die ganzzahligen Werte von $X$ wurden für denervierte und innervierte Extremitäten die dazugehörigen Werte von $Y$ nach Gleichung (III) berechnet und die daraus konstruierten Kurven, die die Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Dosen begrenzen ($P = 0{,}05$) in Abb. 2 eingezeichnet. Es ist daraus ersichtlich, daß die Mittelwerte der ACh Dosen, die an innervierter und denervierter Extremität eine gleiche Kaliumausschüttung verursachen, im gesamten untersuchten Dosenbereich von ACh voneinander signifikant unterschieden sind. Für Grenzdosen ergibt sich durch graphische Ermittlung eine Empfindlichkeitssteigerung des denervierten Muskels gegenüber ACh auf etwa den 100fachen Wert.

Die Konfidenzintervalle für die Steigungen der Geraden (I) und (II) wurden mittels der folgenden Beziehung bestimmt[10], wobei $\beta$ alle Werte von $b$ annehmen kann, die die nachstehend angeführte Ungleichung erfüllen:

$$\left| S_1 \cdot \sqrt{n-2}\, \frac{\beta^* - \beta}{\sigma^*} \right| \leqq t_{0{,}05}.$$

Die derart errechneten Konfidenzintervalle der Steigungen betragen: a) innervierte Extremität: $26{,}35 < \beta < 56{,}97$; (Gerade I). b) denervierte Extremität: $41{,}57 < \beta < 66{,}49$; (Gerade II). Es besteht demnach keine Berechtigung, eine Verschiedenheit der Richtungskoeffizienten, deren wahrscheinlichste Werte nach Gl. (I) 41,66 für die innervierte Extremität, bzw. nach Gl. (II) 54,03 für die denervierte Extremität betragen, anzunehmen.

Es fällt auf, daß die mittlere quadratische Abweichung (s) der Kaliumwerte auf der denervierten Seite etwa doppelt so groß ist wie der ent-

sprechende Wert auf der innervierten Seite: dieser Unterschied ist im wesentlichen auf jenen Beitrag zur Summe der Abweichungsquadrate auf der denervierten Seite zurückzuführen, der von den Kaliumwerten nach höheren ACh-Dosen herrührt. Diese Verhältnisse werden vor allem dann offenkundig, wenn die experimentellen Werte für die denervierte Extremität derart geteilt werden, daß die eine Gruppe alle Wertepaare von der Grenzdosis bis zu einer Dosis von 10,75 $\mu$M und die zweite Gruppe die Wertepaare im Dosenintervall von 5,54—44,2 $\mu$M enthält. Die für diese beiden Gruppen nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate berechneten Geraden lauten: a) niederes Dosenbereich: $y = -65{,}323 + 50{,}795\ x$ (V); b) höheres Dosenbereich: $y = -344{,}026 + 120{,}100\ x$ (VI). Für die Steigung der Geraden (VI) wurde ein Konfidenzbereich von $26{,}84 < \beta < 213{,}36$ ermittelt ($P = 0{,}05$). Ein Vergleich der Konfidenzbereiche der Steigung von Geraden (VI) mit der von Geraden (I) läßt unmittelbar erkennen, daß im Dosenbereich der Teilgeraden (VI) (i. e.: 5,54 bis 44 $\mu$M ACh) der quantitative Zusammenhang zwischen ACh-Dosis und Kaliumausschüttung mit einer größeren Unsicherheit als im niederen Dosenbereich behaftet ist. Trotzdem besteht auch für den Bereich der Geraden (VI) noch eine statistisch signifikante Korrelation ($r = 0{,}65$).

*d) Bestimmung der fermentativen Spaltung von Azetylcholin in der Durchströmungsflüssigkeit.*

Die im folgenden Abschnitt durchzuführenden Berechnungen setzen die Kenntnis der Größe der fermentativen Spaltung von ACh in der Durchströmungsflüssigkeit vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Erreichen des Wirkungsortes voraus. Zur Abschätzung dieser Größe wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von ACh in der Durchströmungsflüssigkeit für die in den Versuchen vorliegenden Konzentrationen ($10^{-3}$ bis $10^{-5}$ Mol/l) manometrisch bestimmt*: während der ersten zehn Minuten nach Substratzusatz ergab sich dabei eine Hydrolyserate von 5% der Anfangsmenge pro Minute.

Andererseits wurden für die mittlere Verweildauer einer intraarteriell injizierten Substanz mit Hilfe von „Evan's Blau" unter den vorliegenden Durchströmungsbedingungen Werte von 20 bis 30 sec gemessen. Die während dieser Zeitperiode in der Durchströmungsflüssigkeit erfolgende enzymatische Zerstörung von ACh ist demzufolge nur etwa 1—2% der injizierten Dosis und kann für die weiteren Betrachtungen vernachlässigt werden.

### 3. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Als Ort des Kaliumaustrittes ist in erster Linie die motorische Endplatte in Betracht zu ziehen, da diese sowohl am innervierten[24] als auch

* Die manometrischen Messungen wurden von E. Herzfeld durchgeführt.

am denervierten[26] Muskel wesentlich empfindlicher für die depolarisierende Wirkung des ACh ist, als die umgebende Muskelmembran. Quantitative Beziehungen zwischen Kaliumaustritt durch die Ep-Region und depolarisierender Wirkung von ACh können zunächst aus den Arbeiten von Katz und Mitarb.[7, 15] über die „Kurzschlußnatur" der Transmitterwirkung auf die Ep hergeleitet werden. Demnach tritt durch die Einwirkung von ACh eine Erniedrigung des Membranpotentials der Ep auf den Wert des Diffusionspotentiales zwischen Myoplasma und Extracellulärflüssigkeit ein, wobei nunmehr alle Ionen entsprechend ihren Konzentrationsgradienten durch die Membran ungehindert ein- bzw. austreten können. Für die Kaliumionen würde dies bedeuten, daß sie für den Zeitraum der vollständigen Membrandepolarisation entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten aus dem Zellinneren mit einer durch ihre Permeabilitätskonstante ($P$) vorgegebenen Geschwindigkeit in den Extracellulärraum austreten. Die Größe des Gesamtaustrittes der Kaliumionen während einer Zeitdauer $t_d$ des Bestehens eines „Kurzschlusses" ist demnach durch folgende Beziehung gegeben:

$$Q = A \cdot P \cdot t_d \cdot (C_i - C_a), \qquad \text{(VIII)}$$

wobei im vorliegenden Falle $A$ die Gesamtfläche aller Endplatten der Muskulatur einer Extremität und $C_i$ bzw. $C_a$ die intracelluläre bzw. extracelluläre Konzentration der Kaliumionen in Mol pro Lliter bedeuten; $t_d$ ist demzufolge als mittlere Dauer des „Kurzschlusses" des Ep-Kollektivs einer Extremität zu interpretieren; $A$ kann auf Grund der Angaben von Eccles[12] unter Berücksichtigung eines Wertes von $10^{-4}$ cm$^2$ für die Fläche einer Ep und einer Anzahl von $10^6$ Ep pro Extremität mit einer Größe von $10^2$ cm$^2$ angesetzt werden. Für $P$ wurde für die folgenden Berechnungen ein Wert von $2{,}7 \cdot 10^{-7}$ cm sec$^{-1}$ verwendet[13]. Für $(C_i - C_a)$ verwendeten wir einen Wert von $10^{-1}$ Mol/l. Die geringfügigen Änderungen von $C_i$, die von einigen Autoren nach chronischer Denervierung beobachtet wurden, wurden nicht berücksichtigt[1, 20]. Ebenso wurden die kurzdauernden durch den Kaliumaustritt bedingten Veränderungen von $C_i$ bzw. $C_a$ vernachlässigt, da diese bei der Differenzbildung in Formel (VIII) relativ geringfügig ins Gewicht fallen. Auf der rechten Seite der Gleichung (VIII) verbleibt somit als einzige, unter den gegebenen Versuchsbedingungen variable Größe $t_d$, i. e. die Zeitdauer der maximalen Depolarisation, wodurch Gleichung (VIII) die Form:

$$Q = K \cdot t_d \qquad \text{(VIIIa)}$$

annimmt.

Die statistische Auswertung unserer Versuchsergebnisse führte andererseits zu einer linear logarithmischen Abhängigkeit zwischen der Kaliumausschüttung $Q$ und der verabreichten ACh-Dosis von der Art:

$$Q = a + b \cdot \log (\text{ACh}). \qquad \text{(IX)}$$

Wenn die aus den Annahmen der „Kurzschlußtheorie" abgeleitete Beziehung (VIIIa) für die quantitative Beschreibung der vorliegenden Versuchsergebnisse geeignet sein soll, muß es möglich sein, eine Beziehung:

$$t_d = F\,(\mathrm{ACh}) \qquad \text{(VIIIb)}$$

von der Art zu finden, daß Gleichung (VIIIa) die Form der Gleichung (IX) annimmt.

Ein näherer Einblick in die Art des funktionellen Zusammenhanges zwischen ACh-Dosis und der Zeitdauer $t_d$ der Einwirkung einer maximal depolarisierenden ACh-Konzentration konnte aus den folgenden Überlegungen und ergänzenden Versuchen gewonnen werden:

a) Zunächst wurde angenommen, daß der Konzentrationsablauf von ACh in der Gewebsflüssigkeit im wesentlichen dem gleichen Zeitgesetz gehorcht, wie in der intravasalen Flüssigkeit und nur zeitlich phasenverschoben verläuft; dafür spricht der hohe Wert der Diffusionskonstante des ACh: $D = 8 \cdot 10^{-6}\ \mathrm{cm^2\ sec^{-1}}$ [14].

b) Das Zeitgesetz des intravasalen Konzentrationsablaufes einer in den arteriellen Schenkel durch Einzelinjektionen zugeführten Substanz wurde wegen der leichteren analytischen Nachweisbarkeit mit Hilfe von „Evan's Blau" untersucht.

Zu diesem Zwecke wurde an der im methodischen Teil beschriebenen Durchströmungsanordnung „Evan's Blau" in Dosen von 200 $\mu$g bis 2 mg in 1,0 ml Lösungsvolumen innerhalb einer Sekunde in den Aortenschlauch injiziert und die Konzentration des Farbstoffes in der Ausströmungsflüssigkeit in Sammelperioden von je 5 sec kolorimetrisch bestimmt. Zur Auswertung der Meßergebnisse wurden die in den einzelnen Sammelperioden ausgeschiedenen Farbstoffmengen in % der injizierten Dosis ausgedrückt und im logarithmischen Maßstab auf der Ordinate gegen die Zeit in linearen Maßeinheiten aufgetragen.

Es zeigte sich dabei, daß die für jeden der 10 Versuche erhaltenen Meßpunkte trotz verschiedener Farbstoffdosen und von Versuch zu Versuch verschieden eingestellten Durchströmungsgeschwindigkeiten (im Bereich von 20 bis 50 ml/min) einen linearen Verlauf aufwiesen, wobei die Steigungen der das logarithmische Zeitgesetz darstellenden Geraden untereinander nur geringfügig abwichen. In Abb. 3a sind die Mittelwerte der in den einzelnen Sammelperioden (5 sec) ausgeschiedenen Farbstoffmengen in % der Dosis aus diesen Versuchen auf der Ordinate im logarithmischen Maßstab aufgetragen.

Da innerhalb der einzelnen Versuche die Durchflußmengen während der Dauer der Farbstoffausscheidung immer konstant blieben, geht aus den Werten der Abb. 3a hervor, daß der Konzentrationsverlauf des „Evan's Blau" sowohl in der ansteigenden als auch in der absteigenden Phase einem logarithmischen Zeitgesetz folgt. Es ist weiters daraus ersichtlich, daß die Zeitdauer $t_1$, während der eine Kozentration größer als $c_1$ aufrechterhalten wird, hauptsächlich durch die Zeitkonstante des loga-

rithmischen Abfalles bestimmt wird. Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse kann Abb. 3a in der vereinfachten Form der Abb. 3b dargestellt werden, aus der die Beziehung:

$$\log c_0 - \log c_1 = k_1 \cdot t_1 \qquad \text{(X)}$$

unmittelbar abzulesen ist, wobei $k_1 = \operatorname{tg} \alpha$ und $c_0$ die Maximalkonzentration nach einer bestimmten Farbstoffdosis in der Durchströmungsflüssigkeit zum Zeitpunkt $t_0$ bedeuten; $t_0$ wurde in der vereinfachten

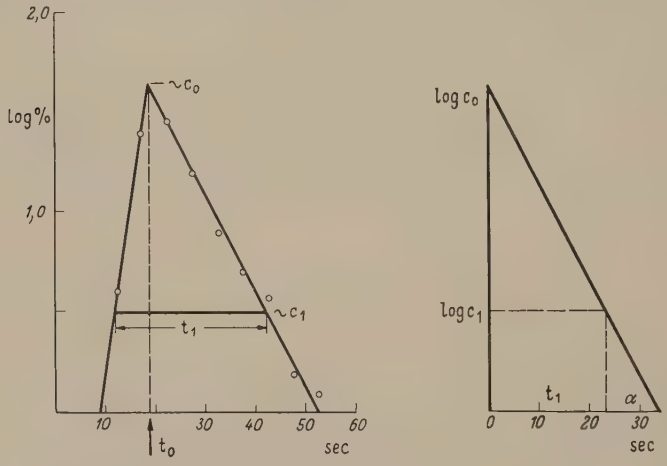



Abb. 3a und 3b: Siehe Text.

Form der Abb. 3b gleich Null gesetzt. Als Maximalkonzentration stellt $c_0$ eine der injizierten Farbstoffdosis proportionale Größe dar. Die Anwendung dieser Ergebnisse zur Herleitung einer Beziehung zwischen $t_d$ und der ACh Dosis (VIIIb) führt zur Aufstellung folgender Gleichungen:

$$c_0 = k_2\,(\text{ACh}); \qquad \text{(XI)}$$

$$t_d = 1/k_1 \cdot \log\,(\text{ACh}) + 1/k_1 \cdot \log k_2/c_d; \qquad \text{(XII)}$$

Die Größe $t_d$ ist nach Gl. (VIII) definiert und $c_d$ bedeutet jene ACh-Konzentration, von der ab eine maximale Depolarisation der Endplatten und damit ein von Null verschiedener Wert von $t_d$ in Erscheinung tritt. Gl. (XII) stellt die gesuchte Funktion (VIIIb) zwischen $t_d$ und (ACh) dar; setzt man nun die rechte Seite von Gl. (XII) an Stelle von $t_d$ in Gl. (VIIIa) ein, so erhält man:

$$Q = K/k_1 \cdot \log k_2/c_d + K/k_1 \cdot \log\,(\text{ACh}). \qquad \text{(XIII)}$$

Gl. (XIII), die aus den Voraussetzungen und Annahmen der „Kurzschlußtheorie" unter Berücksichtigung des Zeitgesetzes der „Evan's-Blau"-Ausscheidung hergeleitet wurde, entspricht formal der experimentell gefundenen Beziehung (IX). Es folgt daraus, daß die Steigung der

experimentell gefundenen Dosis-Wirkungsbeziehungen (I) und (II) durch das Verhältnis $K/k_1$ bestimmt wird, woraus hervorgeht, daß die Gesamtfläche ($A$) an der eine nach Gl. (VIII) ablaufende Kaliumfreisetzung stattfindet, im verwendeten Dosenbereich konstant bleibt. Allerdings besteht die Möglichkeit, für die Wertepaare des höheren ACh-Dosenbereiches eine Gerade mit größerer Steilheit anzupassen (VI). Dies deutet darauf hin, daß höhere ACh-Dosen eine Vergrößerung der Austrittsfläche für Kalium bewirken; da jedoch die Steigungen von Geraden (VI) und (I) (Abb. 2) statistisch nicht signifikant voneinander abweichen, wird im folgenden die Ep-Fläche im gesamten Konzentrationsbereich als konstant angenommen.

Ein Vergleich der konstanten Glieder der Gl. (XIII) mit den entsprechenden Konstanten der experimentell ermittelten Gl. (I) und (II) liefert Möglichkeiten zur quantitativen Prüfung der Zulässigkeit der in der Ableitung der Gl. (XIII) getroffenen Annahmen. Zu diesem Zwecke ist es zunächst erforderlich, daß den Gl. (I) und (II) zugrunde gelegte Koordinatensystem derart zu transformieren, daß 1. der Ordinatenmaßstab in Mol angegeben wird und 2. der Nullpunkt des Abszissenmaßstabes beim Logarithmus der ACh-Dosis 1 Mol liegt. Damit nehmen Gl. (I) und (II) die folgenden Formen an:

$$y = Q = 2{,}41 \cdot 10^{-4} + 4{,}16 \cdot 10^{-5} \cdot \log\,(\mathrm{ACh}) \qquad \text{(Ia)}$$

$$y = Q = 4{,}19 \cdot 10^{-4} + 5{,}40 \cdot 10^{-5} \cdot \log\,(\mathrm{ACh}). \qquad \text{(IIa)}$$

Die Steigung der beiden Gleichungen kann auch unabhängig von den Versuchsergebnissen, aus Gl. (XIII) (i. e. aus dem Wert von $K/k_1$) unter Verwendung der Zeitkonstante der „Evan's Blau"-Ausscheidung ($k_1 = \mathrm{tg}\,\alpha = 0{,}048\ \mathrm{sec}^{-1}$) berechnet werden. Der auf diese Weise für beide Geraden gefundene Wert $K/k_1$ beträgt $5{,}62 \cdot 10^{-5}$ und steht somit mit den experimentell bestimmten, voneinander nicht signifikant unterschiedenen Steigungen von (Ia) und IIa) ($4{,}16 \cdot 10^{-5}$ bzw. $5{,}40 \cdot 10^{-5}$) in guter Übereinstimmung. Die quantitative Übereinstimmung ist derart, daß die getroffenen Annahmen 1. Verwendung der „Kurzschlußtheorie" in Form der Gl. (VIII) und 2. Verwendung des Zeitgesetzes der „Evan's Blau"-Ausscheidung zur Bestimmung des Konzentrationsablaufes von ACh am Wirkungsort (bzw. Dauer der Depolarisation $t_d$) in Form der Gl. (XII) und (XIII) zur Erklärung unserer Versuchsergebnisse berechtigt erscheinen.

Der Vergleich der Koeffizienten von log (ACh) in Gl. (XIII) mit dem entsprechenden numerischen Wert von Gl. (Ia) bzw. (IIa) liefert die folgenden Beziehungen:

$$(K/k_1)_{\mathrm{inn.}} = 4{,}16 \cdot 10^{-5}\ \text{(XIVa)};\quad (K/k_1)_{\mathrm{den.}} = 5{,}40 \cdot 10^{-5} \qquad \text{(XIVb)}$$

Die Konstante $K$ ist eine nach Gl. (VIII) bzw. (VIIIa) definierte Transportkonstante von der Größe: $A \cdot P \cdot (C_i - C_a) = 2{,}7 \cdot 10^{-6}\ \mathrm{Mol/sec}^{-1}$; $k_1$ bedeutet nunmehr die zunächst unbekannte Zeitkonstante des

Konzentrationsabfalles von ACh nach Einzelinjektionen. Der Wert von $k_1$ kann jedoch aus Gl. (XIVa) bzw. (XIVb) bestimmt werden. Da die Mittelwerte der Steigungen von Geraden (I) und (II) bzw. (Ia) und (IIa) nicht genau identisch sind, werden auf diese Weise für $k_{1\,(ACh)}$ zwei verschiedene Werte, nämlich 0,064 für die innervierte und 0,050 für die denervierte Extremität erhalten; diese Werte sind als statistisch nicht signifikant verschieden zu betrachten, da die Steigungen von Geraden (I) und (II) ein gemeinsames Konfidenzintervall besitzen.

Durch Vergleich der konstanten Glieder von Gl. (XIII) mit denen der Gl. (Ia) bzw. (IIa) werden nach Einsetzen der bekannten Größen die beiden folgenden Gleichungen erhalten:

$$(\log k_2/c_d)_{\text{inn.}} = 5{,}68 \text{ (XVa)}; \quad (\log k_2/c_d)_{\text{den.}} = 7{,}75 \qquad \text{(XVb)};$$

Bildung der Differenz zwischen (XVa) und (XVb) liefert nach Entlogarithmieren den Wert 117,0 für das Verhältnis der depolarisierenden Grenzkonzentrationen von ACh an innervierter und denervierter Extremität ($c_{d,\,\text{inn.}}/c_{d,\,\text{den.}}$).

Die Berechnung der Absolutwerte von $c_d$ für innervierte und denervierte Extremität aus den Gl. (XVa) bzw. (XVb) setzt die Kenntnis der durch Gl. (XI) definierten Konstante $k_2$ voraus; $k_2$ besitzt die Dimension $cm^{-3}$ und setzt sich numerisch aus dem Umrechnungsfaktor von injizierter Dosis in Mol in den Konzentrationswert Mol/liter i. e. $10^3$ und aus einem zunächst nicht näher bekannten Verdünnungsfaktor für die Konzentration der injizierten Lösung in der Blutbahn zusammen. Der Wert von $k_2$ ist aus dem bisher vorliegenden Versuchsmaterial nicht bestimmbar; hingegen gelang es in einer weiteren Versuchsreihe mit Tetramethylammonium[32] durch Vergleich der Grenzdosis für die Kaliumausschüttung nach Einzelinjektion mit der Grenzkonzentration für die Kaliumausschüttung bei Durchströmung mit tetramethylammonium-haltigen Lösungen einen Wert für $k_2$ direkt zu ermitteln. Da $k_2$ im wesentlichen durch die in beiden Versuchsreihen gleichgehaltenen Durchströmungsbedingungen bestimmt wird, kann der für Tetramethylammonium ermittelte Wert von $k_2$ = annähernd 200 auch für die ACh-Versuche angewendet werden. Damit ergibt sich aus Gl. (XVa) für $c_d$ der innervierten Muskulatur: $4{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol/liter und aus Gl. (XVb) für $c_d$ der denervierten Muskulatur: $3{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol/liter. Die so errechnete Grenzkonzentration für maximale Depolarisation am denervierten Muskel liegt in derselben Größenordnung wie die von Fatt[13] bestimmte ACh-Konzentration, die am isolierten Froschmuskel zu einer maximalen Depolarisation führt. Der Unterschied in den Werten der ACh-Grenzkonzentrationen an innervierter und denervierter Muskulatur entspricht dem Befund von Nicholls[26], wonach die Schwellenkonzentration von ACh am denervierten Froschmuskel rund 100mal niedriger als am normalen Froschmuskel ist.

Eine weitere Möglichkeit der Prüfung der Brauchbarkeit der „Kurzschlußtheorie" in Form von Gl. (VIII) für die Erklärung der Kaliumausschüttung besteht in der Berechnung von $t_d$ für verschiedene ACh-Dosen aus den entsprechenden Werten von $Q$ nach Gl. (VIII) (Tab. 2).

Die derart errechneten Zeiten für das Bestehen einer „Kurzschlußdepolarisation" liegen für den verwendeten Dosenbereich von ACh in der Größe von Bruchteilen von Sekunden bis zu 1 min. Elektrophysiologische Messungen von Burns u. Paton[4] ergaben nach intraarterieller Injektion von ACh in den Gracilismuskel der Katze eine Depolarisationsdauer von mehreren Sekunden bzw. von mehreren Minuten nach Eserinvorbehandlung. Die auf Grund der Kaliumausschüttung errechneten Zeiten liegen damit in derselben Größenordnung wie die tatsächlich gemessenen.

*Tabelle 2.*

| Acetylcholin Dosis (Mol) | denerviert | | innerviert | |
|---|---|---|---|---|
| | $Q$ Mol $10^{-6}$ | $t_d$ sec | $Q$ Mol $10^{-6}$ | $t_d$ sec |
| $1{,}7 \cdot 10^{-8}$ | 1,0 | 0,37 | — | — |
| $10^{-7}$ | 42,0 | 15 | — | — |
| $10^{-6}$ | 95,0 | 35 | — | — |
| $10^{-5}$ | 150,0 | 55 | 34 | 12,6 |
| $10^{-4}$ | 203,0 | 75 | 75 | 28,0 |

Es ist nun ferner möglich, aus Gl. (XII) unter Verwendung der Gl. (XVa) und (XVb) diejenigen ACh-Dosen auszurechnen, die unter den Bedingungen unserer Versuchsanordnung an der denervierten bzw. innervierten Extremität eine Dauer der maximalen Ep-Depolarisation von 1 msec (i. e. annähernde Dauer der Depolarisation nach einem physiologischen Einzelimpuls) hervorrufen würden. Diese Dosen betragen für die innervierte Extremität: $2{,}0898 \cdot 10^{-6}$ Mol bzw. als Mittelwert für eine Ep: $2{,}0898 \cdot 10^{-12}$ Mol und für die denervierte Extremität: $1{,}7783 \cdot 10^{-8}$ Mol bzw. als Mittelwert für eine einzige Ep: $1{,}7783 \cdot 10^{-14}$ Mol. Eine analog durchgeführte Rechnung ergibt für eine Depolarisationsdauer von 2 msec folgende hierfür notwendige ACh-Dosen: an der innervierten Extremität: $2{,}0903 \cdot 10^{-6}$ Mol bzw. als Mittelwert für eine einzige Ep: $2{,}0903 \cdot 10^{-12}$ Mol und an der denervierten Extremität: $1{,}7787 \cdot 10^{-8}$ Mol bzw. als Mittelwert für eine einzige Ep: $1{,}7787 \cdot 10^{-14}$ Mol. Durch Differenzenbildung erhält man für jene ACh-Menge, die notwendig ist, um die Dauer der Depolarisation einer Ep von 1 msec auf 2 msec zu verlängern, an der innervierten Muskulatur einen Wert von rund $5{,}0 \cdot 10^{-16}$ Mol und an der denervierten Muskulatur von rund $4{,}0 \cdot 10^{-18}$ Mol. Der Wert an der denervierten Muskulatur liegt dabei in der gleichen Größenordnung wie der an einer Endplatte des normalen Katzengastrocnemius durch einen Einzelimpuls in Freiheit gesetzte ACh-Betrag von rund

$10^{-18}$ Mol[3]. Ein Vergleich des letzteren Werts emit den oben für eine Depolarisationsdauer von 1 msec für eine einzige Ep der innervierten bzw. denervierten Extremität berechneten ACh-Dosen ergibt, daß bei intraarterieller Zufuhr an der innervierten Muskulatur rund $2{,}09 \cdot 10^6$ und an der denervierten Muskulatur rund $1{,}8 \cdot 10^4$ mal mehr ACh zugeführt werden muß, als zur Erreichung der gleichen Wirkung physiologischerweise an der Endplatte in Freiheit gesetzt wird. Ferner ergibt sich aus der Art der Gl. (XIII) und (XII), daß zwischen ACh-Dosis und der Größe der Kaliumausschüttung bzw. Zeitdauer der Depolarisation im Gebiete der physiologischen ACh-Konzentrationen vor allem an der denervierten Muskulatur eine außerordentlich empfindliche lineare Beziehung besteht (rund $10^{-18}$ Mol ACh bewirken Verlängerung der Depolarisation um 1 msec). Die Empfindlichkeit der Funktion nimmt jedoch mit Erhöhung der ACh-Dosen ab. So bewirken z. B. im Dosenbereich von $10^{-5}$ Mol ACh (durchschnittliche Depolarisationsdauer 55 sec) nur mehr $10^{-15}$ Mol ACh pro Ep eine Verlängerung der Depolarisationsdauer um 1 msec.

Aus den hier dargelegten Auswertungen der mitgeteilten Versuchsergebnisse im Sinne der „Kurzschlußtheorie" der Wirkung von ACh auf die motorische Ep ergibt sich nun, daß der *denervierte* Muskel sich hinsichtlich seiner Empfindlichkeit gegenüber von außen zugeführtem ACh (ACh-Grenzkonzentration, ACh-Dosen für Erreichung physiologischer Depolarisationszeiten) weitgehend in ähnlicher Weise verhält wie der normale intakte Muskel gegenüber dem unter physiologischen Bedingungen an der Ep in Freiheit gesetzten ACh. Die um den Faktor 117,0 höher liegenden Grenzkonzentrationen der Kaliumausschüttung bzw. depolarisierenden Grenzdosen für extern zugeführtes ACh an der innervierten Muskulatur legen den Gedanken nahe, daß hier eine Diffusionsschranke durch die Abschlußmembranen der Ep-Kammer geringere ACh-Mengen bzw. Konzentrationen als an der denervierten Muskulatur zur Einwirkung kommen läßt. Diese Diffusionsbarriere scheint demnach in der der Denervation folgenden Zeitperiode (frühestens vom 4. Tag an) offenbar durch Degeneration der neuralen Anteile der Ep-Region weitgehend zum Wegfall zu kommen, so daß nunmehr von außen zugeführtes ACh eine ähnliche Wirkung an den muskulären Anteilen der Ep ausübt wie intern unter physiologischen Bedingungen in Freiheit gesetztes ACh.

Inwieweit die enzymatische Hydrolyse des ACh für die unterschiedliche Empfindlichkeit von denervierter und innervierter Muskulatur verantwortlich gemacht werden kann, wird an Hand von Versuchen mit Eserin gesondert besprochen werden[23]. Jedenfalls steht fest, daß nach Denervierung keine nennenswerte Verminderung der Aktivität der ACh-Esterase des Skeletmuskels auftritt[8].

Was nunmehr die eingangs zitierte Möglichkeit einer partiellen Depolarisation der Endplatte durch bestimmte Konzentrationen von

ACh betrifft, so kann hierzu auf Grund der durchgeführten Überlegungen und Berechnungen folgendes angeführt werden: Bei Bestehen einer Abhängigkeit des Potentials der Ep-Membran von der ACh-Konzentration wird $K$ in Gl. (VIIIa) selbst eine Funktion der ACh-Dosis, wobei dann ein Abweichen der log Dosis Wirkungsbeziehung von der linearen Form zu erwarten ist. In dem von uns untersuchten ACh-Dosenintervall ist dies jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der Fall. Die rechnerisch durchgeführte Extrapolation auf die Gebiete der physiologischen ACh-Dosen bzw. Depolarisationszeiten ergab, daß auch in diesem Bereich mit Hilfe der Gl. (XII) und (XIII) plausible Werte für die zur Aufrechterhaltung einer vollständigen Depolarisation von einigen Millisekunden Dauer erforderlichen Dosisinkremente von ACh erhalten werden.

Das Gesamtergebnis der Auswertung unserer Versuche erweist somit, daß die Annahmen der „Kurzschlußtheorie" und die aus ihr abzuleitenden Folgerungen zur quantitativen Beschreibung und Deutung der vorliegenden Versuchsergebnisse ausreichen, und zumindest für weite Dosenbereiche keine komplizierteren Annahmen erforderlich sind.

## Zusammenfassung.

1. An isoliert durchströmten Hinterextremitäten von Katzen wurde die Abgabe von Kaliumionen aus der Muskulatur an die Durschströmungsflüssigkeit nach intraarterieller Injektion von Acetylcholin bestimmt; die Versuche wurden vergleichend an normal innervierten und chronisch denervierten Extremitäten (8—12 Tage Intervall) durchgeführt.

2. Zwischen den Logarithmen der Acetylcholindosen und der jeweiligen Gesamtmenge an zusätzlich freigesetztem Kalium besteht an der innervierten und denervierten Extremität eine lineare Beziehung.

3. Die beiden Dosiswirkungskurven verlaufen angenähert parallel, wobei die Empfindlichkeit des denervierten Muskels gegenüber Acetylcholin rund 100fach größer ist als die des innervierten Muskels.

4. Das Zeitgesetz des Konzentrationsablaufes einer intraarteriell in Einzeldosen injizierten Substanz wurde in der vorliegenden Versuchsanordnung mit Hilfe von „Evan's Blau" bestimmt.

5. Mit Hilfe des so bestimmten Zeitgesetzes konnte gezeigt werden, daß eine befriedigende quantitative Erklärung der gefundenen Kaliumfreisetzung auf Grund der „Kurzschlußtheorie" der Wirkung von Acetylcholin auf die motorische Endplatte (Katz u. Fatt) gegeben werden kann.

## Literatur.

[1] Bogatzki, M., u. L. Fischer: Über den Kaliumhaushalt des quergestreiften Muskels nach Denervierung. Z. exper. Med. **118**, 143 (1951). — [2] Boyle, P. J., and E. J. Conway: Potassium accumulation in muscle and associated changes. J. of Physiol. **100**, 1 (1941). — [3] Brown, G. L., H. H. Dale and W. Feldberg: Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and eserine. J. of Physiol. **87**, 394

(1936). — [4] Burns, B. D., and W. D. M. Paton: Depolarisation of the motor endplate by decamethonium and acetylcholine. J. of Physiol. **115**, 41 (1951). — [5] del Castillo, J., and B. Katz: Electrophoratic application of acetylcholine to the two sides of the end-plate membran. J. of Physiol. **125**, 16P (1954). — [6] del Castillo, J., and B. Katz: Quantal components of the endplate potential. J. of Physiol. **124**, 560 (1954). — [7] del Castillo, J., and B. Katz: The membrane change produced by the neuromuscular transmitter. J. of Physiol. **125**, 546 (1954). — [8] Couteaux, R., and D. Nachmannsohn: Changes of cholinesterase at endplates of voluntary muscles following section of sciatic nerve. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **43**, 177 (1940). — [9] Cowan, S. L.: The initiation of all-or-none responses in muscle by acetylcholine. J. of Physiol. **88**, 3P (1936). — [10] Cramér, R.: Mathematical methods of statistics. Princeton Univ. Press 1946. — [11] Creese, R.: Measurement of cation fluxes in rat diaphragm. Proc. Roy. Soc. (B) **142**, 496 (1954). — [12] Eccles, J. C.: The neurophysiological Basis of mind. Oxford 1953. — [13] Fatt, P.: The electromotive action of acetylcholine at the motor and-plate. J. of Physiol. **111**, 408 (1950). — [14] Fatt, P.: Biophysics of junctional transmission. Physiologic. Rev. **34**, 674 (1954). — [15] Fatt, P., and B. Katz: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. of Physiol. **115**, 320 (1951). — [16] Fenn, W. O.: Electrolytes in muscle. Physiologic. Rev. **16**, 450 (1936). — [17] Fenn, W. O., R. Gerschman, G. Fischer, J. Lacy, M. D. Bailly and J. L. Wright: Experiments on the role of Potassium in the blocking of neuromuscular transmission by curare and other drugs. J. Gen. Physiol. **34**, 607 (1951). — [18] Goldman, D. E.: Potential, impedance and rectification in membranes. J. Gen. Physiol. **27**, 37 (1943). — [19] Hardt, A., u. A. Fleckenstein: Über die Kaliumabgabe des Froschmuskels bei Einwirkung kontrakturerzeugender Stoffe und die Hemmung der Kaliumabgabe durch kontrakturverhütende Lokalanaesthetika. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 39 (1949). — [20] Hines, H. M., and G. C. Knowlton: Changes in the skeletal muscle of the rat following denervation. Amer. J. Physiol. **104**, 379 (1933). — [21] Hodgkin, A. L.: The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. Rev. Cambridge Philos. Sec. **26**, 339 (1951). — [22] Klupp, H., u. O. Kraupp: Über die Freisetzung von Kalium aus der Muskulatur unter der Einwirkung einiger Muskelrelaxantien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 340 (1954). — [23] Kraupp, O., W. Kobinger, H. Stormann u. G. Werner: Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skelettmuskulatur durch Acetylcholin. (Im Druck.) — [24] Kuffler, S. W.: Specific Excitability of the Endplate Region in normal and denervated muscle. J. of Neurophysiol. **6**, 99 (1943). — [25] Cattel, Mc. K., and H. Civin: The influence of asphyxia and other factors on the serum potassium of cats. J. of Biol. Chem. **126**, 633 (1938). — [26] Nicholls, J. G.: The electrical properties of denervated skeletal muscle. J. of Physiol. **123**, 2P (1954). — [27] Pappenheimer, J. R., E. M. Renkin and L. M. Borrero: Filtration, Diffusion and Molecular Sieving trough peripheral capillary membranes. Amer. J. Physiol. **167**, 13 (1951. — [28] Reginster, A.: Recherches sur le role du potassium dans les phénomènes d'excitation. Arch. internat. Physiol. **47**, 24 (1938). — [29] Riesser, O., u. W. Steinhausen: Über das elektrische Verhalten des Muskels bei Einwirkung von Acetylcholin. Pflügers Arch. **197**, 288 (1922). — [30] Somogyi, J. C., u. F. Verzar: zitiert nach [19]. Helvet. med. Acta 7, Suppl. VI, (1940/41). — [31] Somogyi, J. C., u. F. Verzar: Die Wirkung von Acetylcholin auf das Kalium des quergestreiften Muskels beim normalen und adrenalectomierten Tier. Arch. internat. Pharmacodynamie **65**, 221 (1941). — [32] Werner, G., O. Kraupp, W. Kobinger u. H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skelettmuskulatur durch Tetramethylammoniumbromid. (Im Druck.)

Dr. O. Kraupp, Wien/Österreich, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 319—327 (1955).

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

# Zur Charakterisierung des Angriffspunktes der Veratrinalkaloide an der glatten Muskulatur.

Von

R. Meier, J. Tripod und Ch. Brüni.

Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 13. Mai 1955.)*

Die Eingruppierung des Angriffspunktes einer pharmakologischen Wirkung als adrenergische, cholinergische, muskulotrope und histaminergische Wirkung usw. kann nicht ohne weiteres durch die Feststellung der direkten Wirkung erfolgen. Hierfür kann die Beeinflußbarkeit des primären Effektes einer Substanz durch Antagonisten dienen. Es ist auf Grund vieler Untersuchungen festgelegt, daß typische autonome Antagonisten eine hohe spezifische Wirkung besitzen, und daß somit diese Methode genügt, um einen Angriffsmechanismus zu bestimmen.

Es wurde bereits in früheren Arbeiten von uns dargelegt, daß das Verhältnis von chemischer Struktur zum Receptorsystem nicht nur dahin zu charakterisieren ist, daß eine Spezifität besteht. Ebenso wichtig ist für die Analyse der gesamten Beziehung zum Rezeptorsystem die Feststellung, inwieweit in gesetzmäßiger Weise eine Variation der Spezifität an verschiedenen Objekten, die Kombination von mehreren Wirkungsqualitäten in einer chemischen Substanz, regelwidrige antagonistische Verhältnisse u. a. von der chemischen Struktur bedingt sind[1].

Wir haben über derartige Fälle der besonderen „Wirkungsspezifitäten" chemischer Strukturen bereits mehrfach berichtet [14, 15, 26].

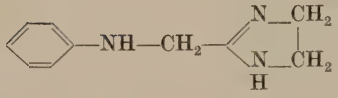
So findet sich beispielsweise in der Gruppe der Imidazoline bei im Prinzip ähnlicher Grundstruktur eine außergewöhnlich große Vielseitigkeit spezifischer Effekte, sympathikomimetische, sympathikolytische, histaminergische, Antihistamin-Wirkung (siehe Tab. 1), so daß angenommen werden muß, daß die relativ geringen Änderungen der molekularen Zusammensetzung für die Änderung der Wirkungsspezifität genügen.

Ferner zeigen eine Reihe dieser Substanzen an bestimmten Organen spezifische Wirkungen, die dem typischen Wirkungscharakter zuzuordnen sind, während sie an anderen Organen fehlen, bei denen der Hauptvertreter der Gruppe wie Adrenalin, Histamin usw. diese Wirkungen besitzt. Auch hier zeigt sich, daß trotz einem generell typischen Charakter Ausnahmen der Spezifität vorhanden sind.

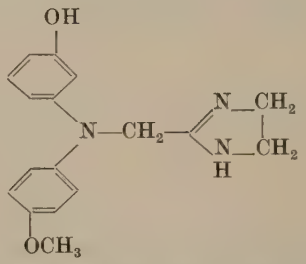
Weiterhin haben wir einzelne Beispiele dafür angegeben, daß in einer Struktur Wirkungen, z. B. antagonistische gegenüber Acetylcholin und Histamin in gleicher Wirkungsstärke in einer chemischen Substanz ver-

einigt sind. Es scheint daraus hervorzugehen, daß diese chemische Struktur gleich starke Spezifitätsbeziehungen zu beiden in Frage kommenden Receptorsystemen besitzt. Alle derartigen Variationen müssen letzten Endes als durch die „Struktur des Receptorsystems" bedingt erklärt werden.

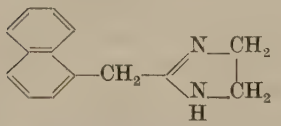
*Tabelle 1.*



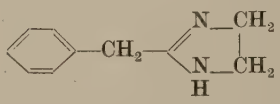
sympathikomimetisch: Otrivin



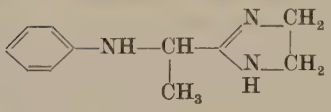
sympathikolytisch: Regitin



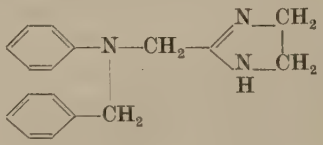
sympathikomimetisch: Privin



sympathikolytisch: Priscol



histaminergisch: Nr. 4895 (24)



Antihistamin: Antistin

Für die Weiterbehandlung dieses Problems scheinen alle Beispiele von Wirkungsrelationen geeignet, welche besondere Beziehungen zwischen chemischer Substanz und Receptorsystem aufzeigen, da sie für die Entwicklung von Annahmen über die Organisation des Receptorsystems dienen können.

Bei der Untersuchung von Veratrumalkaloiden ist uns eine neue eigenartige Variante derartiger Receptorbeziehungen aufgefallen, die uns von prinzipiellem Interesse zu sein scheint.

Die toxischen und pharmakologischen Wirkungen verschiedener Alkaloide des Veratrums[9], Protoveratrin[20] und andere, sind bisher größtenteils am *Ganztier* untersucht worden.

Die Wirkung besitzt ganz bestimmte Besonderheiten, die sie als abweichend von der typischen autonomen Wirkung kennzeichnet; so ist für die Kreislaufwirkungen die Stimulation zentripetaler Impulse vagalen Charakters verantwortlich zu machen[9, 13] usw.

Es wurde weiterhin festgestellt, daß die Wirkung des Veratrins durch Vagotomie, Antihistamine und Calcium[20], und besonders durch Lokalanaesthetica [13, 16, 17] siehe auch [9], gehemmt werden kann. Ferner wurde nachgewiesen, daß für die Kontraktur des Veratrins am quergestreiften Muskel und am Herzen ein Antagonismus durch hohe Dosen von Atropin[11, 19], Pilokarpin[11], Novocain[19, 21] und andere Lokalanaesthetica[21], Calcium[6, 10] und Kalium[3] besteht; z. T. scheint Kalium auch synergistisch zu wirken[2, 6]. Es liegen aber relativ wenige Untersuchungen hinsichtlich der Wirkungscharakterisierung der Veratrumalkaloide an den üblichen Testen mit *isolierten Organen* zur Abklärung ihres „autonomen" Wirkungsangriffspunktes vor. Neben Angaben über vasoconstrictorische, bzw. dilatatorische Wirkung [8, 25] zit. bei [9, 7] finden sich solche über kontraktionsauslösende Wirkung an verschiedenen Organen[9], insbesondere Kaninchen- und Meerschweinchendarm[20] oder Meerschweinchenuterus, wobei Atropin, Calcium und vor allem Kalium einen gewissen Antagonismus zeigten[1].

Aus diesen Untersuchungen kann also nicht geschlossen werden, ob die Wirkung des Veratrins trotz ihrer allgemeinen Besonderheiten in irgendeiner Weise zu einer Gruppe der „autonomen Receptorsysteme" besondere Beziehungen aufweist. Bei der Untersuchung der hypotensiven Wirkung der Veratrine sind wir mehrfach auf die Beobachtung gestoßen, daß diese Alkaloide typische Wirkungen an *isolierten* Organen auslösen. Es schien deshalb interessant, diese Wirkung im einzelnen zu charakterisieren.

## Methodik.

Als typische Untersuchungsobjekte haben wir den isolierten Meerschweinchen-Dünndarm und die isolierte Samenblase gewählt. Der Effekt der Veratrumalkaloide an diesen Objekten ist ein stimulierender. Wir haben deshalb die antagonistische Beeinflußbarkeit im Vergleich mit den spezifisch stimulierenden Substanzen des autonomen Systems, Acetylcholin und Histamin am isolierten Dünndarm, und Adrenalin an der Samenblase untersucht.

Das isolierte Meerschweinchenjejunum wurde in einem Organgefäß bei 38° C suspendiert. Als Durchströmungsflüssigkeit diente mit $O_2$ und 5% $CO_2$ gesättigte Tyrode folgender Zusammensetzung: NaCl 0,8 + $CaCl_2$ 0,02 + KCl 0,02 + $NaH_2PO_4$ 0,005 + $MgCl_2$ 0,01 + $NaHCO_3$ 0,05 + Glucose 0,1%.

Die Meerschweinchensamenblase wurde in Locke-Lösung folgender Zusammensetzung suspendiert: NaCl 0,86 + $CaCl_2$ 0,024 + KCl 0,036 + $NaHCO_3$ 0,07 + Glucose 0,1%. Temperatur 38° C.

Die nachfolgend aufgezählten Werte stellen Mittel von 3—5 Versuchen dar; angegeben sind die Endkonzentrationen im Organgefäß.

## Versuchsergebnisse.

*Isolierter Meerschweinchendarm.* Der primär erregende Effekt von Veratrin, (Ph.H.V) der Protoveratrine A und B, eines Gemisches enthaltend 60% Protoveratrin A und 40% Protoveratrin B*, sowie von Acetylcholin und Histamin als Bezugssubstanzen, ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

---

* Herrn Dr. Jeger, ETH Zürich, sind wir für die Überlassung der Protoveratrine zu Dank verpflichtet.

*Tabelle 2.*

| Erregungssubstanz | Primäre Erregung am isolierten Meerschweinchendarm (Minimalkonzentration) |
|---|---|
| Veratrin . . . . . | $10^{-7}$ |
| Gemisch A + B . . | $10^{-7}$ |
| Protoveratrin A . . | $10^{-7}$ |
| Protoveratrin B . . | $3 \times 10^{-7}$ |
| Acetylcholin . . . | $3 \times 10^{-9}$ |
| Histamin . . . . . | $3 \times 10^{-9}$ |

Es ergibt sich aus Tabelle 2, daß die 4 Alkaloide des Veratrums 30 bis 100mal weniger aktiv sind in ihrer stimulierenden Wirkung als Histamin und Acetylcholin. In qualitativer Hinsicht ist die durch die Veratrumalkaloide hervorgebrachte Kontraktion langsamer in ihrer Entwicklung als diejenige, die durch Acetylcholin und Histamin hervorgerufen wird. Worauf dieser Unterschied zu beziehen ist, kann nicht gesagt werden; theoretisch könnte es sich um eine Permeabilitätsfrage handeln. Auch

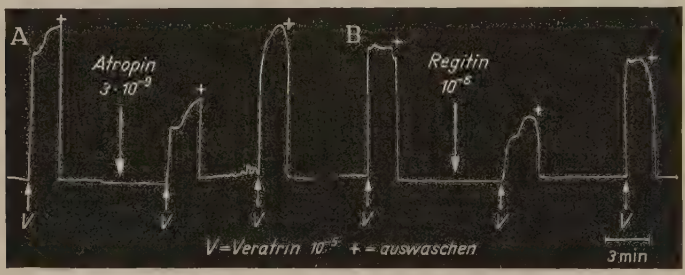



Abb. 1. Isolierter Meerschweinchendarm. Die durch Veratrin Ph.H.V $10^{-5}$ erzeugte Kontraktur wird bereits durch $3 \times 10^{-9}$ Atropin gehemmt (A), während Regitin erst in einer Konzentration von $10^{-6}$ einen entsprechenden Effekt hervorruft (B).

der Rückgang der Kontraktion zum normalen ist nach Auswaschen von einer relativ längeren Zeitdauer. Es besteht außerdem eine Tachyphylaxie.

Die antagonistische Beeinflußbarkeit dieser Wirkungen wird mit Hilfe der spezifischen Antagonisten, Atropin, Regitin (vgl. S. 320), Pyribenzamin (N-2-pyridil-benzyl-N′-dimethyl-äthylen-diamin als Chlorhydrat) charakterisiert.

Wenn man eine Kontraktion mit einer vollwirksamen Alkaloiddosis erzeugt und sie durch Blockierung cholinergischer, adrenergischer oder histaminergischer Receptoren mit Atropin, Regitin[5] oder Pyribenzamin[12] zu verhindern sucht, so ergibt sich, daß die Kontraktion nur durch Atropin gehemmt wird. Regitin wirkt erst in viel höheren Dosen antagonistisch (Abb. 1).

Hinsichtlich der antagonistischen Wirksamkeit von Pyribenzamin und Atropin zeigt sich ein ganz ausgesprochener spezifischer Unterschied. Während die Wirksamkeit von Atropin gegenüber Acetylcholin und die-

jenige von Pyribenzamin gegenüber Histamin etwa von der gleichen Größenordnung sind, wird die Veratrinkontraktur durch Atropinkonzentrationen aufgehoben, die 50—100mal niedriger sind als diejenigen von Pyribenzamin.

Die Konzentrationen von Atropin, Regitin und Pyribenzamin, welche die durch die untersuchten Wirksubstanzen hervorgerufene Kontraktion zu 90—100% hemmen, sind in der Tab. 3 zusammengefaßt.

*Tabelle 3.*

| Erregungssubstanz und Konzentration | | Isolierter Darm: Antagonismus durch | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Atropin | Regitin | Pyribenzamin |
| Acetylcholin | $5\times10^{-7}$ | $3\times10^{-8}$ | $10^{-5}$ | $10^{-5}$ |
| Histamin | $5\times10^{-8}$ | $3\times10^{-6}$ | $3\times10^{-6}$ | $10^{-8}$ |
| Veratrin | $10^{-5}$ | $10^{-7}$ | $10^{-5}$ | $10^{-5}$ |
| Gemisch A + B | $10^{-5}$ | $10^{-7}$ | $10^{-5}$ | $5\times10^{-6}$ |
| Protoveratrin A | $10^{-5}$ | $10^{-7}$ | $10^{-5}$ | $10^{-5}$ |
| Protoveratrin B | $10^{-5}$ | $10^{-7}$ | $10^{-5}$ | $10^{-5}$ |

Atropin ist demnach gegenüber den Veratrumalkaloiden etwa 50 bis 100mal wirksamer als Regitin oder Pyribenzamin.

Es kann also darüber kein Zweifel bestehen, daß Atropin gegenüber der Veratrumalkaloidwirkung eine spezifische, antagonistische Beeinflussung ausübt, die in ihrer Spezifität derjenigen gegenüber Acetylcholin gleichkommt. Zwischen den einzelnen Veratrumalkaloiden sind kleine Unterschiede vorhanden, aber sie sind relativ so gering, daß ihnen keine besondere Bedeutung zukommen kann. Auf Grund dieser Befunde sollte man zur Annahme geneigt sein, daß diese Veratrinkontraktion zum parasympathischen System eine nähere Beziehung hat als zu anderen Receptorsystemen.

*Isolierte Meerschweinchensamenblase.* Die Versuche an der isolierten Samenblase ergeben zunächst ein ähnliches Bild. Die Veratrumalkaloide zeigen alle eine stimulierende Wirkung.

Die Tab. 4 gibt die kontraktionswirksamen Konzentrationen an; die durch die Veratrumalkaloide hervorgerufene Kontraktion wird im allgemeinen durch das Auswaschen verstärkt.

*Tabelle 4.*

| Erregungssubstanz | Primäre Erregung an der isolierten Meerschweinchensamenblase (Minimalkonzentration) |
|---|---|
| Veratrin . . . . . | $10^{-6}$ |
| Gemisch A + B . . . | $10^{-5}$ |
| Protoveratrin A . . | $10^{-5}$ |
| Protoveratrin B . . | $3\times10^{-5}$ |
| Acetylcholin . . . | $10^{-8}$ |
| Histamin . . . . . | $10^{-8}$ |
| Adrenalin . . . . | $10^{-7}$ |

Zusätzlich zu den in der Tab. 3 verwendeten Wirksubstanzen haben wir auch Adrenalin verwendet, dessen erregende Wirkung an der Samenblase bekannt ist (4, 22). In diesem Test sind die 4 Veratrumalkaloide durchwegs 100—1000fach schwächer wirksam als Acetylcholin oder Histamin und etwa 10—100fach schwächer als Adrenalin. Unter sich weichen sie wenig voneinander ab, mit Ausnahme vielleicht des Protoveratrins B, das etwas weniger wirksam zu sein scheint als Protoveratrin A.

In qualitativer Hinsicht gelten die gleichen Bemerkungen, die schon für die am isolierten Meerschweinchendarm erzeugte Kontraktion gemacht wurden: Kontraktionsverlauf und besonders Rückkehr zur normalen Tonuslage sind langsamer, ebenso nimmt nach dem Auswaschen die Kontraktion an Intensität zu; sehr häufig läßt sich eine ausgeprägte Tachyphylaxie beobachten. Es wurde nun in gleicher Weise die antagonistische Beeinflussbarkeit der Wirkung durch Atropin, Regitin und Pyribenzamin festgestellt.

Wenn die „cholinergischen" oder „adrenergischen" Receptoren der isolierten Samenblase durch Vorbehandlung mit Atropin oder Regitin „blockiert" werden, erweist sich die letztere Substanz als bedeutend wirksamerer Antagonist (Abb. 2).

Die Konzentrationen von Atropin, Regitin oder Pyribenzamin, welche eine durch die untersuchten Erregungssubstanzen hervorgerufene Kontraktion zu 90—100% abschwächen, sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

*Tabelle 5.*

| Erregungssubstanz und Konzentration | | Isolierte Samenblase: Antagonismus durch | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Atropin | Regitin | Pyribenzamin |
| Acetylcholin | $5\times10^{-7}$ | $3\times10^{-8}$ | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ |
| Histamin | $5\times10^{-8}$ | $3\times10^{-5}$ | $10^{-5}$ | $10^{-8}$ |
| Adrenalin | $3\times10^{-6}$ | $6\times10^{-5}$ | $10^{-7}$ | $> 10^{-4}$ |
| Veratrin | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ | $10^{-7}$ | $10^{-4}$ |
| Gemisch A + B | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ | $10^{-7}$ | $10^{-4}$ |
| Protoveratrin A | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ | $10^{-7}$ | $10^{-4}$ |
| Protoveratrin B | $10^{-4}$ | $10^{-4}$ | $10^{-7}$ | $10^{-4}$ |

Wie die Tab. 5 zeigt, finden wir, daß die Spezifität der Antagonisten Atropin gegenüber Acetylcholin, Pyribenzamin gegenüber Histamin und Regitin gegenüber Adrenalin in der typischen Weise vorhanden ist, und daß ein Konzentrationsunterschied von etwa 100—1000 die spezifische antagonistische Wirksamkeit von der relativen Unwirksamkeit gegenüber anderen primären Effektoren trennt.

Es wäre nun an sich vielleicht zu erwarten gewesen, daß auch an diesem Objekt, welches prinzipiell auf Acetylcholin anspricht, ebenfalls Atropin der ausgesprochenste Antagonist der Veratrumalkaloide wäre.

Um so auffallender ist es, daß hier nicht das Atropin, sondern das Regitin einen spezifischen Antagonismus von etwa der gleichen Größenordnung zeigt, wie es ihn gegenüber Adrenalin besitzt. Sowohl Atropin, wie auch in Übereinstimmung mit den Befunden am isolierten Darm Pyribenzamin, üben keine spezifische antagonistische Wirkung aus. Es könnte auf

Abb. 2. Samenblase des Meerschweinchens. Die durch Veratrin Ph.H.V $10^{-4}$ hervorgerufene Kontraktion wird durch Atropin $5 \times 10^{-6}$ gehemmt (A); Regitin ist bereits in einer Konzentration von $3 \times 10^{-8}$ wirksam (B).

Grund dieser Befunde der Schluß zu ziehen sein, daß an diesem Objekt die Wirkung des Veratrins dem sympathischen Receptorsystem zuzuordnen ist.

## Diskussion.

Man ist geneigt, bei den auffallenden Befunden den Versuch zu machen, Anhaltspunkte hinsichtlich des Angriffspunktes der Veratrinalkaloide zu gewinnen. Die Erwägung hat auf folgender Feststellung zu basieren:

Die geprüften Alkaloide des Veratrums, Protoveratrin A und B, ein Gemisch A + B und „Veratrin" bewirken sowohl am isolierten Dünndarm als auch an der Samenblase eine Kontraktion, welche sich nur in ihrem Verlauf von der Kontraktion durch spezifische, autonome Erregungssubstanzen unterscheidet.

Trotzdem an beiden untersuchten Objekten einerseits Acetylcholin und Histamin bzw. Adrenalin, Histamin und Acetylcholin kontraktionserregend sind, läßt sich eine spezifische Beeinflußbarkeit der Veratrinwirkung in jedem Falle nur durch einen typischen, aber von Organ zu Organ verschiedenen Antagonisten erzielen. Am isolierten Darm wird die Wirkung der Veratrumalkaloide durch Atropin und an der isolierten Samenblase durch Regitin gehemmt. Es ergibt sich somit, daß die Zuordnung der Veratrinwirkung bzw. des Angriffspunktes je nach dem Organ, wenn auf die antagonistische Beeinflußbarkeit abgestellt wird, im ersten Falle zum parasympathischen, im zweiten Falle zum sympathischen System erfolgen müßte.

Es können neben der verschiedenen Reaktion mit einem Receptorsystem mehrere Erklärungsmöglichkeiten erwogen werden, wie Freisetzung von Acetylcholin oder Adrenalin, ein muskulärer Angriffspunkt usw. Anhaltspunkte in dieser Richtung ergeben sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht.

Nimmt man bei der hohen Spezifität des Antagonismus die Wirkung des Veratrins als eine direkte Wirkung auf das autonome Receptorsystem an, so kann die an zwei verschiedenen glattmuskulären Organen beobachtete Änderung des Receptorverhaltens nur durch eine Verschiedenartigkeit des Receptorsystems erklärt werden, da das auslösende Agens, „Veratrin", in beiden Fällen das gleiche ist.

Die Änderung des Receptorsystems kann in folgendem gesucht werden:

Wird das Receptorsystem als eine präformierte Organisation mit fixierten mosaikförmig angeordneten Reaktionspunkten aufgefaßt, so ist eine von Organ zu Organ verschiedene Anordnung derselben denkbar für ein System, das auf 2 oder 3 primäre Wirkungen ansprechen soll. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, daß Veratrin bei im Molekül prinzipiell vorhandener Eignung zu einer doppelten Reaktionsweise im ersten Fall mit einem andern Mosaik von Receptorpunkten reagiert wie im zweiten.

Eine weitere Variante könnte darin bestehen, daß in Receptorsystemen, in denen das eine auf zwei, das andere auf drei primäre Reaktoren reagiert, dadurch eine verschiedene Reaktionsfähigkeit zustande kommt, daß ein Receptor eine bevorzugte Stellung einnimmt. Im ersten Falle wäre dann der acetylcholinanaloge Receptor, im zweiten Fall der adrenalinanaloge Receptor für die Veratrinreaktion bevorzugt.

Als weitere Möglichkeit käme in Betracht, daß außer dem separierten spezifischen Receptorsystem ein Hauptreceptor existiert[23], von dem sekundär die durch Histamin, Acetylcholin, usw. beeinflußten bzw. spezifisch hemmenden Receptoren abhängig sind. Es könnten dann unabhängig die sekundär abhängigen Receptorsysteme beeinflußt werden und nun in verschiedener Weise die primäre Wirkung hemmen, eine Möglichkeit, welche wir bereits für die Hemmung der Bariumchlorid-Wirkung durch Adrenalin und Acetylcholin diskutiert haben[18].

Auf Grund der vorhandenen Daten kann zwischen diesen und eventuell anderen Möglichkeiten nicht entschieden werden. Trotzdem ist die hier vorliegende Frage von ungewöhnlicher Bedeutung für das Zustandekommen der spezifischen Reaktionsfähigkeit chemischer Stoffe. Die vorliegende Mitteilung scheint neben unseren früheren Arbeiten[14, 15, 18, 23, 26] dazu geeignet, die sich bietende Problemstellung klarer zu erfassen und diese vielleicht bei Vorliegen weiterer Daten einer allgemeineren Behandlung zugänglich zu machen.

**Zusammenfassung.**

Die untersuchten Veratrumalkaloide bewirken am isolierten Dünndarm und an der isolierten Samenblase eine Kontraktion von etwas langsamerem Verlauf als diejenige der durch autonome erregende Stoffe ausgelösten Kontraktion.

Da am Darm Acetylcholin und Histamin, an der Samenblase Acetylcholin, Histamin und Adrenalin eine Kontraktion hervorrufen, wird der Antagonismus der spezifischen Antagonisten Atropin, Pyribenzamin und Regitin zur Charakterisierung des Angriffspunktes der Veratrinwirkung untersucht.

In auffallender Weise wird die Kontraktion durch Veratrumalkaloide am isolierten Dünndarm durch Atropin, an der isolierten Samenblase durch Regitin in spezifisch bevorzugter Weise aufgehoben.

Zur Erklärung des Spezifitätswandels der Veratrinwirkung wird die Organisation des sie bedingenden Receptorsystems diskutiert.

**Literatur.**

[1] Backman, E. L.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **90**, 128 (1924). — [2] Bacq, Z. M.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **130**, 1369 (1939). — [3] Boehm, R.: Hdb. d. exp. Pharmakol. II/1, 249 (1920). — [4] Brügger, J.: Helvet. physiol. Acta **3**, 117 (1945). — [5] Gross, F., J. Tripod u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 352. — [6] Harvey, A. M.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **68**, 494 (1940). — [7] Kobert, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **22**, 77 (1887). — [8] Kondo, S.: Acta Scholae med. univ. imp. Kioto **3**, 19 (1919). — [9] Krayer, O., and G. H. Acheson: Physiologic. Rev. **26**, 383 (1946). — [10] Lamm, G.: Z. Biol. **38**, 223 (1911). — [11] Loewi, O., u. J. Solti: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **97**, 272 (1923). — [12] Mayer, R. L., C. P. Huttrer and C. R. Scholz: Science (Lancaster, Pa.) **102**, 93 (1945). — [13] Meier, R., H. J. Bein u. H. Helmich: Experientia **5**, 484 (1949). — [14] Meier, R.: Ann. New York Acad. Sci. **50**, 1161 (1950). — [15] Meier, R., u. H. J. Bein: Biochim. et Biophysica Acta **4**, 144 (1950). — [16] Meier, R., u. H. J. Bein: Bull. schweiz. Akad. Med. Wiss. **6**, 209 (1950). — [17] Meier, R., u. H. J. Bein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 119 (1952). — [18] Meier, R., u. J. Tripod: Helvet. physiol. Acta **8**, 137 (1950). — [19] Riesser, O., u. Z. Neuschlos: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **92**, 254 (1922). — [20] Rothlin, E., u. Cerletti, A.: Schweiz. med. Wschr. **1954** 137. — [21] Schüller, J., u. F. Athmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **91**, 125 (1921). — [22] Tripod, J., u. R. Meier: Experientia (Basel) **6**, 307 (1950). — [23] Tripod, J., et R. Meier: Arch. internat. Pharmacodynamie **99**, 104 (1954). — [24] Urech, E., A. Marxer u. K. Miescher: Helvet. chim. Acta **33**, 1386 (1950). — [25] Willson, J. R., and R. G. Smith: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **79**, 208 (1943). — [26] Wirsing, F.: Diss. Basel (1949).

Prof. Dr. Rolf Meier, Wissenschaftl. Laboratorien d. CIBA Aktiengesellschaft, Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 328—334 (1955).

Aus dem Physiologischen Institut der Karls-Universität Prag (Direktor: Prof. Dr. F. Karásek) und dem Institut für Medizinische Chemie der Karls-Universität Pilsen (Direktor: Doz. Dr. J. Štěpán).

# Über die Pharmakologie von Produkten des Cholins mit Nicotinsäure.

Von

L. Krulich, J. Heller, J. Štěpán.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 31. März 1955.)*

Produkte des Cholins mit Nicotinsäure haben wir bereits im Jahre 1939 bei der Herstellung von Cholnic[9] untersucht. Das ist das Natriumsalz mit einer kleinen Menge Cholinsalz der Nicotinsäure[10].

Es hat sich mit gutem Erfolg bei der Behandlung von angiospastischen Zuständen, sowohl im Verlauf der Arteriosclerosis obliterans, als auch bei der Buergerschen Krankheit und beim vasoneurotischen Typ der Raynaudschen Krankheit bewährt. Bei einigen Formen von Hypertension wirkte es als Vasodilatans[11, 6, 4]. Im Handel waren zwei isotonische Präparate, und zwar Cholnic mite 1% und Cholnic forte 4,07%, das eine kleine Menge von Percain enthielt.

Außerdem haben wir das Cholinsalz der Nicotinsäure[7] $[(CH_3)_3NCH_2CH_2OH]^+$ $[C_5H_4NCOO]^-$. $H_2O$ und das Chlorid-hydrochlorid des Cholinnicotinsäureesters $[(CH_3)_3NCH_2CH_2OCOC_5H_4NH]^{++}2Cl^-$ hergestellt, das durch die üblichen Verfahren nicht verseifbar ist[8]. Erst nach Überführung in die Base mit Silberhydroxyd kommt es zur Verseifung. Das Dichlorid des Esters reagiert in wäßriger Lösung sauer und kann durch Natriumbikarbonat in das Chlorid $[(CH_3)_3NCH_2CH_2OCOC_5H_4N)^+Cl^-$ übergeführt werden.

Nikotinylcholinperchlorat wurde in der Literatur bei den Estern des Cholins erwähnt[2], die eine Depression des Blutdruckes bewirken, es entspricht bei Hunden etwa $^1/_{5000}$ einer äquimolaren Menge des Acetylcholins.

In dieser Arbeit behandeln wir die Toxikologie und die Pharmakologie des Cholinsalzes der Nicotinsäure. Diese Verbindung kristallisiert als Monohydrat und ist sehr hygroskopisch. Polyhydrat bildet eine harte kristallinische Masse, die etwa 45—47% Nicotinsäure enthält (polarographisch bestimmt). Im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure sinkt der Cholingehalt. Außerdem befassen wir uns mit der Toxikologie und der Pharmakologie des Chlorids und Chlorid-hydrochlorids des Cholinesters der Nicotinsäure.

## Methodik.

*Toxicität.* Die Bestimmung der LD 50 wurde mit der Methode von Behrens an weißen Mäusen in Gruppen von 6—10 Tieren durchgeführt, und zwar einerseits mit dem Cholinsalz, sowie mit dem Chlorid und dem Chlorid-hydrochlorid des Cholin-

esters der Nicotinsäure. Die Verbindungen wurden zu 5—10% in physiologischer Lösung subcutan injiziert. Mäuse, die das Experiment überlebten, wurden nach 7—14 Tagen durch elektrischen Schlag getötet und seziert. Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Nebennieren wurden gewogen und ihr Gewicht im Verhältnis zum Körpergewicht der Maus prozentuell berechnet. Einer Hälfte der Kontrolltiere wurde nur physiologische Lösung in einer Menge von 0,2—0,4 ml injiziert. Diese Kontrolltiere wurden auf die gleiche Weise getötet und alle Organe nach Färbung mit Hämatoxylineosin histologisch untersucht.

*Die Wirkung auf den Blutdruck* wurde nach der gewohnten blutigen Methode in der Art. carotis comm. bestimmt, bei 30 Kaninchen in Narkose mit 1,0—1,5 g Urethan per kg, bei 3 Katzen unter 50 mg Chloralose + 300 mg Urethan per kg. In der Mehrzahl der Fälle wurde gleichzeitig die Atmung durch Trachealkanüle registriert.

*Die direkte Wirkung* des Esters *auf den Gefäßtonus* verfolgten wir mittels Perfusion eines isolierten Kaninchenohres und isolierter Hinterbeine einer Ratte mit warmer, sauerstoffhaltiger Tyrodelösung. Die Anzahl der abfallenden Tropfen des Perfusats wurden mit dem Totalisator registriert.

## Ergebnisse.

Die LD 50 des Polyhydrats des Cholinsalzes war 530 mg/kg, des Chlorids des Esters 1600 mg/kg, des Chlorid-hydrochlorids des Esters

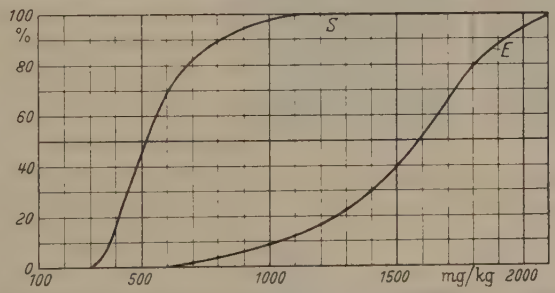



Abb. 1. Verhältnis der Dosis zum Sterblichkeitsprozentsatz der Mäuse. *S* Polyhydrat des Salzes, *E* Chlorid des Cholinesters der Nicotinsäure.

1460 mg/kg (Abb. 1). Nach Applikation des Chlorid-hydrochloridesters kommt es infolge der sauren Reaktion bei Mäusen zu Hautnekrosen bis auf die Fascia, wodurch die Toxicität erhöht wird.

Bei der Applikation einer letalen Salzdosis ist das Versuchstier anfangs unruhig, später treten krampfartige Bewegungen auf, die von angestrengtem Atmen begleitet sind. Bei dem Ester tritt der Tod höchstwahrscheinlich durch Ausbleiben der Atmung ein. Histologisch verursachte das Polyhydrat des Cholinsalzes der Nicotinsäure vereinzelt kleine Knoteninfiltrationen in der Leber. In der Leber der Mäuse wurden nach Applikation des Esters diseminierte Knoteninfiltrationen im Parenchym und Verschwinden des Glykogens festgestellt, in der Milz überall ausgeprägte Durchblutung, in den Nieren Stauungen im Mark, die auch bei einigen normalen Tieren vorkamen. (Vgl. Tab. 1: Organgewichte.)

*Wirkung auf den Blutdruck.* Das Polyhydrat des Cholinsalzes der Nicotinsäure bewirkt in Mengen von 0,5—1,0 mg/kg eine mäßige

Depression des Blutdruckes, dessen Größe und Verlauf der Wirkung der äquivalenten Menge Cholinchlorids entspricht, und die man mit Atropin blockieren kann.

Tabelle 1. *Die Durchschnittsgewichte der Mäuse und ihrer Organe.*

| Gruppe (Vorbehandlung) | Gewicht | Herz % | Lunge % | Leber % | Milz % | Nieren Nebennieren % | Anzahl der Tiere |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| normale . . . . . | 18,4 | 0,75 | 1,31 | 5,6 | 0,85 | 1,54 | 17 |
| normale . . . . . | 19,0 | 0,62 | 0,96 | 4,97 | 0,93 | 1,63 | 19 |
| normale . . . . . | 23,0 | 0,72 | 0,93 | 5,9 | 0,47 | 1,76 | 44 |
| normale . . . . . | 23,5 | 0,67 | 0,99 | 5,2 | 0,38 | 1,87 | 36 |
| physiologische Lösung | 26,5 | 0,77 | 0,88 | 5,0 | 0,46 | 1,78 | 39 |
| Salz (Polyhydrat) . . | 16,5 | 0,69 | 1,06 | 5,3 | 0,98 | 1,72 | 37 |
| Salz (Polyhydrat) . . | 22,6 | 0,71 | 0,93 | 4,92 | 0,36 | 1,91 | 40 |
| Chlorid des Esters . . | 24,0 | 0,89 | 1,06 | 6,7 | 0,51 | 1,92 | 28 |
| Chlorid-hydrochlorid des Esters . . . . | 18,2 | 0,65 | 1,15 | 5,7 | 0,90 | 1,58 | 50 |

Prinzipiell ist die Wirkung des Chloridesters die des Chlorid-hydrochloridesters ähnlich. Durch injizieren von Essigsäure von gleichem $p_H$ wie die saure Lösung des Chlorid-hydrochloridesters entsteht eine abweichende Reaktion.

Der Ester verursacht auch ausgeprägte Veränderungen der Atmung, deren Charakter in gewissem Maße von der Größe der Dosis abhängt.

Gleichzeitig mit dem ersten Absinken des Druckes verflachen sich die Atembewegungen oder sie bleiben auf einige Sekunden ganz aus. Nach großen Dosen ist die Druckerhöhung am meisten ausgeprägt, wobei sie nach kurzer, geringer Absenkung einsetzt und Werte von 15—30 mm Hg über dem Ausgangsblutdruck erreicht. Durch vorhergehende Verabreichung von Atropin wird die Wirkung des Esters nicht unterdrückt, nur die erste Senkung des Druckes ist einigermaßen verringert (Abb. 2). Durch Physostigmin wird seine Wirkung überhaupt nicht beeinflußt, vorhergehende Applikation des Esters ändert die Reaktion auf Acetylcholin nicht (Abb. 3). Die Erhöhung des Blutdrucks nach Adrenalin beeinflußt der Ester ebenfalls nicht. Adrenolytische Stoffe (Dihydroergotamin, Dibenamin) unterdrücken die vorübergehende Blutdruckerhöhung, so daß nach vorhergehender Applikation der Ester nur eine Druckerniedrigung bewirkt wird, die sich laufend ausgleicht. Die Veränderung der Atmung ist in keinem dieser Fälle beeinflußt. Kleine Dosen des Esters wirken ähnlich wie Lobelin.

*Die direkte Wirkung auf den Gefäßtonus.* In Konzentrationen von ungefähr 1:10000 bewirkt der Ester merkbare Dilatation, die nach kurzer vorübergehender Vasoconstriction eintritt.

Auf die Tätigkeit des isolierten, auf einer STRAUB-Kanüle aufgehängten Froschherzens wirkt der Ester nicht einmal in großen Mengen.

Auf dem isolierten Darm einer Ratte im MAGNUS-Bade bewirkt der Ester in hohen Konzentrationen (4:10000) eine Erniedrigung des Tonus und in beträchtlichem Maße hemmt er die durch Acetylcholin oder Histamin hervorgerufene Kontraktion. Geringere Konzentrationen sind unwirksam.

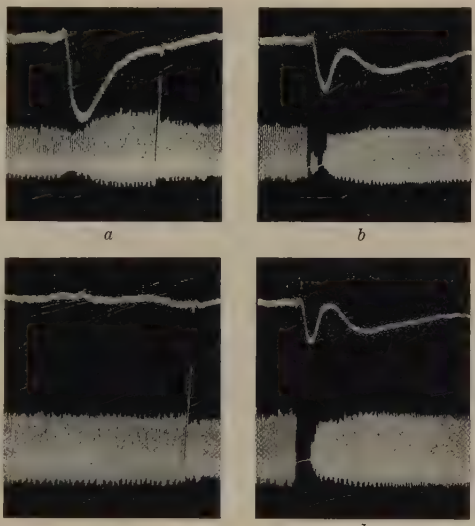


Abb. 2. a) 2 $\gamma$ Acetylcholin i.v., b) 4 mg Chlorid des Esters i.v., c) und d) ebenso nach vorhergehender Applikation von 125 $\gamma$ Atropin.

### Diskussion.

Das Polyhydrat des Cholinsalzes der Nicotinsäure wird in der Lösung hydrolysiert, seine Wirkung kommt dem freigewordenen Cholin zu. Nicotinsäure hat keinen Einfluß auf den Blutdruck[5].

Nach längerem Aufbewahren im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure und Phosphorpentoxyd erhält man einen kristallinischen, sehr unbeständigen Stoff, der elementar-analytisch einem Monohydrat des Cholinsalzes der Nicotinsäure entspricht. Dieser Stoff wirkt auf den Blutdruck ähnlich wie Acetylcholin und seine UV-Extinktionskurve weicht von der des Polyhydrates ab. Auch die LD 50 bei Monohydrat ist abweichend und beträgt 1300 mg/kg. Die Atmung ist nach seiner Injektion nicht charakteristisch beeinflußt. Meistens kommt es zu einer vorübergehenden Abflachung der Atmungsbewegungen, die von einigen tiefen Atemzügen gefolgt wird, oder es kommt überhaupt zu keiner Veränderung. Nach Eingabe von 10 mg/kg kam es jedoch zu tiefer Alteration der Atmungsbewegungen.

Die Wirkung des Chlorids und des Chlorid-hydrochlorids des Esters ist kompliziert. Dabei machen sich mehrere Mechanismen geltend.

Den Verlauf der Druckänderungen nach Applikation des Esterchlorids erklären wir folgendermaßen:

Der anfängliche steile Abfall des Blutdrucks und der Atmungsstillstand nach sehr kurzer Latenz und die Ähnlichkeit mit den Veränderungen des Blutdrucks und der Atmung nach Verabreichung von Lobelin sind offenbar reflexive Veränderungen, die durch Reizung der Intero-

receptoren im Glomus caroticum und aorticum, in der Wand der linken Herzkammer und offensichtlich auch in der Pulmonalgegend hervorgerufen wurden und die gewöhnlich unter der Bezeichnung Bezold-Jarisch-Reflex zusammengefaßt wurden[3]. Diese Voraussetzung wird durch den Befund bestätigt, daß die Latenzdauer bei intravenöser

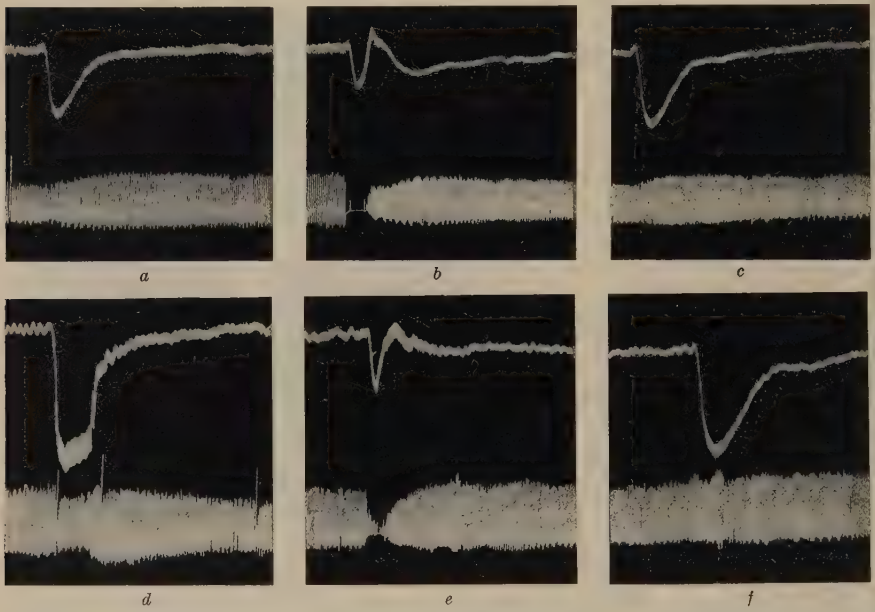



Abb. 3. a) 2 $\gamma$ Acetylcholin i.v., b) 4 mg Chlorid des Esters i.v., c) 2 $\gamma$ Acetylcholin (appliziert nach 5 min), d) 2 $\gamma$ Acetylcholin nach vorhergehender Applikation Physostigmin, e) 4 mg Chlorid des Esters, f) 2 $\gamma$ Acetylcholin.

Applikation 6—7 sec beträgt. Diese Zeit wird als nötig betrachtet, damit die injizierte Flüssigkeit den kleinen Blutkreislauf passieren und in die Coronararterien und die Interoreceptorgegenden in der Aorta und den Carotisarterien gelangen kann. Indessen wird bei Applikation des Esters in die linke Herzkammer (mit einem kleinen, durch die Arteria carotis comm. in die linke Herzkammer eingeführten Katheter) oder in den peripheren Teil der Carotis die Latenz auf 2—3 sec verkürzt. Durch Applikation des Esters in die rechte Herzkammer (mit einem durch die V. jugularis eingeführten Katheter) wird die Latenzdauer nur unwesentlich verkürzt. Bei intracardialer und intracarotidischer Applikation sind bereits Mengen von 10—20 $\gamma$-Ester wirksam, die bei intravenöser Applikation ohne oder von nur geringer Wirkung sind (Abb. 4). Für diesen Reflexmechanismus sprechen direkte Befunde, daß sich nach Blockade beider carotidischen Sinus mit Novocain oder nach ihrer mechanischen Denervation und nach gleichzeitigem Durchschneiden beider Nn. vagi

Blutdruckdepression und Ausbleiben der Atmung nicht einmal nach großen Dosen des Esters zeigen. Bloße Unterbrechung der Nn. vagi oder bloßes Ausschalten des Carotis-Sinus schwächen die Wirkung des Esters nur ab, schalten sie jedoch nicht vollkommen aus. Das spricht dafür, daß der Ester sowohl auf die kardialen Interoreceptoren als auch auf carotidische Gebiete einwirkt.

Vorübergehende Druckausgleichung, eventuell vorübergehende Erhöhung kann nicht als Kompensation der vorangegangenen Erniedrigung

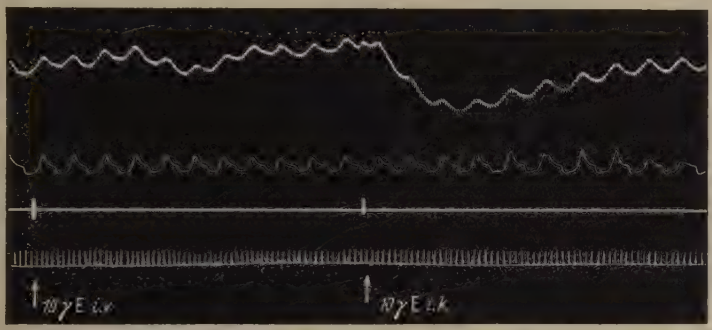


Abb. 4. Blutdruck bei der Katze. 10 $\gamma$ Chlorid des Esters i.v. und intrakardial.

angesehen werden, da sie auch eintritt, wenn es zu keiner Druckerniedrigung kam (nach Durchschneiden der Nn. vagi und Blockade der Carotis-Sinus) und ist offensichtlich durch Vasoconstriction infolge Aktivation des Sympathicus verursacht. Dafür sprechen auch die Umstände, daß die Elevation um so ausgeprägter ist, eine je größere Menge des Esters appliziert wird und vor allem die Tatsache, daß man diesen Effekt mit adrenolytischen Stoffen unterdrücken kann. Ob die Aktivation des Sympathicus reflexiven oder zentralen Charakters ist, wurde nicht entschieden.

Die zweite, länger andauernde Erniedrigung des Blutdruckes, die der Elevation folgt, ist wahrscheinlich durch die Abschwächung des Gefäßtonus bewirkt, die durch direktes Einwirken des Esters auf die Gefäßmuskulatur hervorgerufen wird. Darauf würden die Befunde hinweisen, daß der Ester an isolierten Organen Vasodilatation bewirkt und auch die glatte Muskulatur des Darmes hemmt, endlich indirekt auch die Tatsache, daß dieser Effekt nach Ausschalten der Interoreceptorengegenden nicht verschwindet, d. h., daß er demnach nicht Bestandteil des oben beschriebenen Reflexmechanismus ist.

## Zusammenfassung.

Es wurden Toxicität und pharmakologische Wirkung des Cholinsalzes der Nicotinsäure, des Chlorids und des Chlorid-hydrochlorids des Esters der Nicotinsäure verfolgt.

Die Wirkung des Polyhydrats des Cholinsalzes der Nicotinsäure entspricht der Wirkung seiner Bestandteile.

Das Chlorid des Cholinesters der Nicotinsäure und das Chloridhydrochlorid bewirken Veränderungen des Blutdruckes, deren Charakter von der applizierten Menge abhängig ist. Mittelgroße Dosen bewirken ein schnelles Absinken des Blutdruckes um 20—30 mm Hg, das von einem vorübergehenden Ausgleich oder einer Erhöhung abgelöst wird, die gleich darauf in einige Minuten dauerndes Absinken des Blutdruckes übergeht. Gleichzeitig mit der initialen Depression kommt es zu einer Abschwächung oder einem Ausbleiben der Atmungsbewegungen.

Die initiale Depression (und das Ausbleiben der Atmung) sind reflexiver Herkunft, und sind durch Reizung der Interoreceptoren in der Gegend des linken Herzens und des Glomus caroticum hervorgerufen. Die vorübergehende Elevation ist eine Folge der durch die Aktivation des Sympathicus hervorgerufenen Vasoconstriction. Die terminale Depression des Blutdruckes ist offensichtlich durch die Abschwächung des Gefäßtonus hervorgerufen, die durch direkte Wirkung des Esters auf die Gefäßmuskulatur eintritt.

## Literatur.

[1] Burn, I. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin: Springer 1937. — [2] Carr, C. J., and F. K. Bell: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **91**, 169 (1947). — [3] Dawes, G. S., and I. H. Comroe: Physiologic. Rev. **34**, 167 (1954). — [4] Filip, L.: Kreislauferkrankungen. Prag: Medizinischer Verlag 1949. — [5] Krulich, L.: Čas. lék. čes. **91**, 1401 (1952). — [6] Reiniš, Zd.: Čas. lék. čes. **80**, 32, 1239 (1941); Schweiz. med. Wschr. **1942**, 171. — [7] Štěpán, J., V. Král and M. Jureček: Chem. listy **47**, 223 (1953). — [8] Štěpán, J., V. Král and M. Jureček: Chem. listy **49**, 144 (1955). — [9] Štěpán, J., u. Zd. Mansfeld: unveröffentlichte Mitteilungen. — [10] Štěpán, J., V. Král et M. Jureček: Die Pharmazie (1955) im Druck. — [11] Svatoš, Fr.: Čas. lék. čes. **80**, 29, 1079 (1941); Schweiz. med. Wschr. **1942**, 247.

Doz. Dr. J. Štěpán, Institut für medizinische Chemie, Karls-Universität, Pilsen, Tschechoslowakei.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 335—339 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mailand
(Direktor: Prof. E. Trabucchi).

# Über ein ganglienlähmendes Sulphoniumderivat: Das Hexamethylen-1,6-bis-Dimethylsulphonium.

Von
D. Della Bella.

Mit 5 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 20. Mai 1955.)*

Hinsichtlich der Beziehungen zwischen Struktur und Wirkungsweise von Derivaten, die quaternäre Ammoniumgruppen enthalten, wurde schon seit einiger Zeit beobachtet, daß der Ersatz des Stickstoffes durch Schwefel, Phosphor, Arsen oder Antimon, wobei die charakteristische „onium"-Struktur erhalten bleibt, zur Bildung von Verbindungen führt, die dieselben pharmakologischen Eigenschaften aufweisen.

Was die Substitution des Stickstoffes durch Schwefel anbetrifft, so konnten schon Hunt und Renshaw (1925)[4], auf frühere Versuche zurückgreifend[10–2], nachweisen, daß das Trimethylsulphonium analog dem Tetramethylammonium, neben einem durch Atropin antagonisierten Muscarineffekt, einen nicotin- und curareartigen Effekt hervorruft.

Diese Beobachtungen wurden später durch andere Autoren[5] bestätigt. 1942 wiesen Prelog und Mitarb.[8] auf die enge Wirkungsanalogie zwischen dem Acetylcholin und seinem Sulphoniumderivat, dem Acetylsulphocholin hin. Letzteres zeigte, eine durch Eserin deutlich potenziertbare Muscarinwirkung, die allerdings zehnmal geringer war als die des Acetylcholins, und wurde ebenfalls durch die Cholinesterasen hydrolisiert[8].

In letzter Zeit hat Walker[12] bewiesen, daß analog dem Dekamethonium das Dekamethylen-1,10-bis-Dimethylsulphonium eine charakteristische Curarewirkung aufweist, die nicht wesentlich geringer ist als die des d-Tubocurarins*. Demselben Autor zufolge fehlt hingegen diese Wirkung dem analogen Derivat mit 5-Kohlenstoffatomen, also dem Pentamethylen-1,5-bis-Dimethylsulphonium.

Wir haben uns nun mit dem Problem beschäftigt, ob und in welchem Maße das dem Hexamethonium entsprechende Sulphoniumderivat, das

* Eine gewisse Curarewirkung soll auch den Sulphoniumderivaten des Thioharnstoffs mit der allgemeinen Formel

$$(NH_2)_2{=}C{=}S{-}(CH_2)n{-}S{=}C{=}(NH_2)_2 \cdot 2\,HBr$$

zukommen[1].

Hexamethylen-1,6-bis-Dimethylsulphonium* die charakteristische ganglienlähmende Wirkung besitze. Die Synthese und die chemischen Eigenschaften des bei unseren Versuchen verwendeten Hexamethylen-1,6-bis-Dimethylsulphoniumbromids ($S_6$) sind Gegenstand einer im Druck befindlichen Arbeit[3].

## Experimenteller Teil. Material und Methoden.

Die Toxicität des $S_6$ wurde an im Durchschnitt 250 g schweren Ratten bestimmt. Die Untersuchung auf Muskarinwirkung wurde am isolierten Froschherzen, die Untersuchung auf Curarewirkung am Ischiadicus-Gastrocnemius-Präparat der Ratte „in vivo" durchgeführt. Die Wirkung auf den Blutdruck wurde an Ratten, Katzen und Hunden studiert: die Registrierung der Blutdruckwerte erfolgte am heparinisierten Tier durch Einführung einer mit einem Quecksilbermanometer in Verbindung stehenden Glaskanüle in die Carotis oder Femoralis.

Die Hemmung sympathischer Synapsen wurde sowohl durch die Reaktion der Nickhaut der Katze auf elektrische Reizung der präganglionären Fasern des Halssympathicus als auch durch die Blutdruckveränderungen am Hund nach elektrischer Reizung des Splanchnicus, nach intravenöser Verabreichung ganglienreizender Mittel sowie nach Abklemmung beider Carotiden untersucht. Die Hemmung parasympathischer Synapsen wurde durch die Beobachtung der Blutdruckveränderungen nach elektrischer Reizung des peripheren Vagusstumpfes an Ratte und Hund, ferner durch den peristaltischen Reflex des isolierten Ileums des Meerschweinchens[11] sowie durch die Reaktion der Muskulatur des isolierten Magens der Ratte auf die Behandlung mit einem Ganglienreizer untersucht.

## Ergebnisse.

Die durch die Injektion in die *Vena femoralis* der Ratte ermittelte D. L. 50 von $S_6$ betrug 175 mg/kg. Die orale Verabreichung von Dosen, welche 300 mg/kg sogar überstiegen, wurde genau so wie die 10 Tage lang täglich wiederholte Zufuhr von je 100 mg/kg ausgezeichnet vertragen.

Am isolierten Froschherzen bewirkten auch ziemlich konzentrierte Lösungen des $S_6$ ($1 \cdot 10^{-3}$) keine verwertbare Änderung der Kurve. Wie dem Hexamethonium[7] so fehlt also auch dem untersuchten Derivat eine muscarinartige Wirkung. — Am Ischiadicus-Gastrocnemius-Präparat der Ratte „in vivo" zeigte das $S_6$ keine curareartige Aktivität. Die muskuläre Reaktion blieb sowohl bei indirekter als bei direkter Reizung auch nach wiederholter Verabreichung von hohen Dosen des $S_6$ (25 mg/kg) unverändert (Abb. 1). Bei Ratten, Katzen und Hunden verursacht $S_6$ ein Absinken der Blutdruckwerte. Dieser Effekt läßt sich beliebig oft hervorrufen und erweist sich den verwendeten Dosen ziemlich proportional. Er wird durch Vorbehandlung des Tieres mit Atropin (1 mg/kg i. v.) nicht beeinflußt, was somit wiederum das Vorliegen einer muscarinartigen Wirkungskomponente ausschließt[14].

In einer weiteren Versuchsserie haben wir die Wirkung des Derivates auf die peripheren vegetativen Synapsen untersucht. Aus Abb. 2 geht

* Über die Wirkungsweise dieses Derivates haben wir nur einen Hinweis in einer unlängst erschienenen Arbeit von Wien[13] gefunden.

hervor, daß die Behandlung mit verschiedenen Dosen des $S_6$ zu deutlichen Änderungen der Reaktion der Nickhaut der Katze auf elektrische Rei-

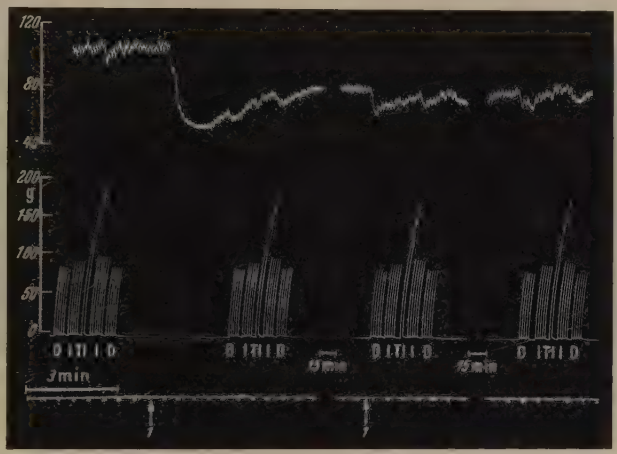



Abb. 1. Ratte 230 g. Narkose: Chloralose (80 mg/kg i.v.). Obere Kurve: Registrierung des arteriellen Blutdruckes (Carotis). Untere Kurve: Muskuläre Reaktion des M. Gastrocnemius (*D* direkte Reizung, *I* indirekte Reizung, *TI* Tetanus durch indirekte Reizung). Bei *I* werden 25 mg/kg $S_6$ intravenös injiziert.

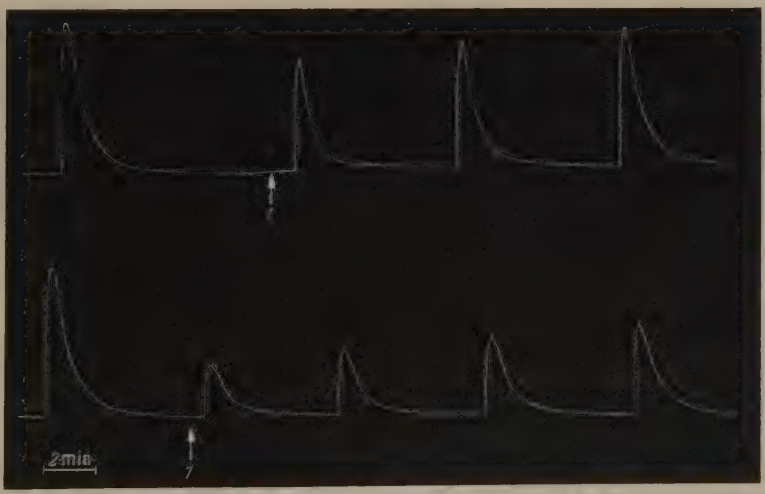



Abb. 2. Katze, 2,4 kg. Narkose: Chloralose (80 mg/kg i.v.). Registrierung der Reaktion der Nickhaut auf elektrische Reizung des oberen Halssympathicus (präganglionär). Obere Kurve: Bei *I* werden 10 mg/kg $S_6$ i.v. injiziert. Untere Kurve: Bei *I* werden 25 mg/kg $S_6$ i.v. injiziert.

zung der präganglionären sympathischen Fasern führt. Dieser ganglioplegische Effekt ließ sich auch in Versuchen am Hund zeigen, in denen $S_6$ die nach elektrischer Reizung des Splanchnicus, nach Abklemmung der Carotiden (Abb. 3) und nach intravenöser Verabreichung eines Ganglien-

reizers, nämlich des Tetra-(dimethylaminomethyl)-methan-tetramethylbromids[6] auftretenden Blutdrucksteigerungen verhinderte.

Von der ganglienlähmenden Wirkung des $S_6$ werden auch ganglionäre Synapsen parasympathischer Natur betroffen. Abb. 4 zeigt, daß die Be-

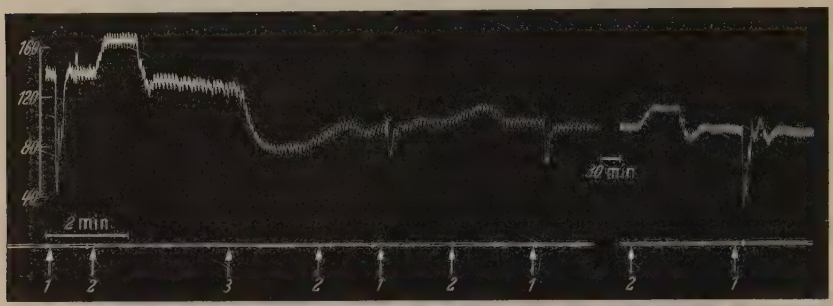



Abb. 3. Hund, 11 kg. Narkose: Chloralose (60 mg/kg i.v.). Registrierung des arteriellen Blutdruckes (A. femoralis). Bei *1* elektrische Reizung des rechten peripheren Vagusstumpfes. Bei *2* Abklemmung beider Carotiden für *60* sec. Bei *3* werden 15 mg/kg $S_6$ intravenös injiziert.

handlung mit $S_6$ zu einer deutlichen und raschen Verminderung der typischen Blutdrucksenkung nach elektrischer Reizung des peripheren Vagusstumpfes führt, hingegen die Blutdruckreaktion auf Acetylcholin

Abb. 4. Ratte, 260 g. Narkose: Chloralose (80 mg/kg i.v.). Registrierung des arteriellen Blutdruckes (Carotis). Bei *1* werden 2$\gamma$/kg Acetylcholin i.v. injiziert. Bei *2* elektrische Reizung des rechten peripheren Vagusstumpfes durch *2* sec. Bei *3* elektrische Reizung des rechten peripheren Vagusstumpfes durch *5* sec. Bei *4* werden 10 mg/kg $S_6$ i.v. injiziert.

praktisch unverändert läßt. Die Dauer des Effektes steht in einer genau bestimmbaren Abhängigkeit zu den verwendeten Dosen. Auch bei oraler Verabreichung ist dieser Effekt erzielbar, und zwar schon 6—8 min nach der Behandlung (50—100 mg/kg an der Ratte).

Die bei der Untersuchung des Peristaltikreflexes am isolierten Meerschweinchendarm beobachtete prompte Reversibilität der Hemmungswirkung des $S_6$ ermöglicht einen quantitativen Vergleich mit Hexamethanium. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, ist $S_6$ etwa 5—10mal weniger wirksam als Hexamethonium. Ein ähnliches Wirksamkeitsverhältnis ergab sich auch in Versuchen am isolierten Rattenmagen, in denen die Hemmungseffekte von $S_6$ und Hexamethonium auf die durch einen Ganglienerreger ausgelösten Muskelkontraktionen miteinander verglichen wurden. Zur

vollen Ausbildung des pharmakologischen Effektes ist, zum Unterschied vom Hexamethonium, eine bestimmte Zeit der Einwirkung des $S_6$ auf das Erfolgsorgan notwendig: nach 1—2 min langer Einwirkung ist z. B.

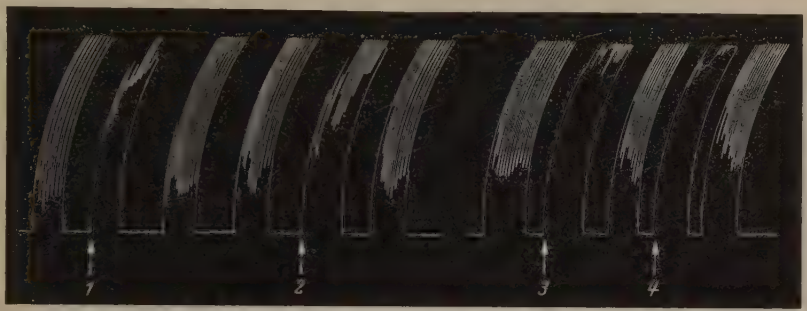



Abb. 5. Peristaltische Reflexe des isolierten Ileums des Meerschweinchen. Bei *1* Einwirkung von Hexamethonium 1:1000000 auf das Organ durch 5 min. Bei *2* Einwirkung von $S_6$ 1:1000000 auf das Organ durch 5 min. Bei *3* Einwirkung von Hexamethonium 1:500000 auf das Organ durch 5 min. Bei *4* Einwirkung von $S_6$ 1:100000 auf das Organ durch 5 min.

die Hemmung des Peristaltikreflexes wesentlich schwächer als nach 5 min langer Einwirkung.

## Zusammenfassung.

Beim Ersatz des Stickstoffes durch Schwefel in einem dem Hexamethonium analogen Derivat bleiben die charakteristischen pharmakologischen Eigenschaften erhalten. Die ganglienlähmende Wirkung des Hexamethylen-1,6-bis-Dimethylsulphonium ($S_6$) manifestiert sich an peripheren sympathischen und parasympathischen Ganglien. Im letzten Falle ist das Aktivitätsverhältnis des $S_6$ zum Hexamethonium ungefähr 1:10. $S_6$, dem jede muscarin- oder curareartige Wirkung fehlt, ist etwa 6 mal weniger toxisch als Hexamethonium[9]. Es wird durch die Schleimhaut des Verdauungstraktes schnell resorbiert.

## Literatur.

[1] Cheymol, J., P. Archier, F. Bourillet et K. Smarzewska: Thérapie **9**, 929 (1954). — [2] Crum-Brown, G. L., and T. Fraser: Proc. Roy. Soc. Edinburgh **7**, 663 (1872). — [3] D'Amico, A., e R. Busacca: Il Farmaco **1955** (im Druck). — [4] Hunt, R., and R. R. Renshaw: J. of Pharmacol. **25**, 315 (1925). — [5] Ing, H., and S. Wright: Proc. roy. Soc. Med. **114**, 48 (1933). — [6] Kensler, C. J., H. Lagermann and C. L. Zirkle: J. of Pharmacol. **110**, 127 (1954). — [7] Paton, W. D. M., and E. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **4**, 381 (1949). — [8] Prelog, W., S. Juhasz, A. Rezek u. P. Stern: Helvet. chim. Acta **25**, 907 (1942). — [9] Reitze, W. R., A. J. Plummer and W. E. Barrett: Federat.Proc. **12**, 360 (1953). — [10] Trendelenburg, P.: Heffter-Handb. exper. Pharmakol. I, 639 (1923). — [11] Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **81**, 55 (1917). — [12] Walker, J.: J. chem. Soc. Lond. **1**, 193 (1950). — [13] Wien, R.: Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 395 (1954). — [14] Zamboni, P.: Arch. ital. sc. farmacol. **4**, 3 (1954).

Or. D. Della Bella, Milano/Italia, Via Andrea del Sarto, 21.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 340—347 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

# Langanhaltende Endoanaesthesie durch Dodecylpolyäthylenoxydäther.

Von
**H. F. Zipf und E. Kreppel.**

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 24. März 1955.)*

Die Dämpfung der Impulsaussendung aus Lungendehnungs- und Herzreceptoren durch intravenöse Injektion der bekannten Lokalanaesthetica wurde vor einiger Zeit von Zipf sowie von Zipf u. Miesterеck herausgestellt. Der große Nachteil der lokalanaesthetisch wirksamen Ester und Nichtester ist ihre sehr kurze Wirkungsdauer von nur wenigen Minuten, die nicht nur mit der schnellen Spaltung der Ester, sondern auch der geringen Haftfähigkeit von Estern und Nichtestern an den inneren sensiblen Receptoren in Zusammenhang zu bringen ist. Es ist auf den ersten Blick nicht verständlich, auf welche Weise die klinisch beschriebenen therapeutischen Dauerwirkungen der bekannten Lokalanaesthetica zustandekommen, es sei denn, man nimmt eine endgültige Beseitigung der pathologischen Erregungsmechanismen an.

Es war deshalb seit einiger Zeit unser Ziel, Körper ausfindig zu machen, die im Hinblick auf die abbauenden Körperfermente einerseits in bestem Sinne „esterasen-fremd" sind, andererseits eine größere Haftfähigkeit an den Membran- und Innenstrukturen der sensiblen Endorgane erwarten ließen. Uns interessierten hierbei verschiedene oberflächenaktive, schäumende Körper aus der Gruppe der Netzmittel. Hier möchten wir über die endoanaesthetischen Wirkungen der Stoffe Do R 9, Do R 9/R 2 und Do R 9/R 3 berichten, die zur Gruppe der Alkylpolyäthylenoxydäther gehören.

Bei Do R 9 handelt es sich um ein Gemisch aus *Dodecylpolyäthylenoxydäthern*, bei dem Dodecylalkohol mit im Mittel 9 Äthylenoxydresten verknüpft ist:

$$C_{12}H_{25} — (OC_2H_4)_n — OH.$$

Do R 9/R 2 und Do R 9/R 3 sind Fraktionen, die von den chemischen Bearbeitern dieser Stoffe, Schoeller u. Mitarb., durch fraktionierte Molekulardestillation aus dem Gemisch Do R 9 erhalten wurden. Do R 9/R 2 enthält durchschnittlich 7,13 Äthylenoxydreste, Do R 9/R 3 im Mittel 11,9 Äthylenoxydreste am Dodecylalkohol gebunden. Alle drei Stoffe zeichnen sich durch starke Oberflächenaktivität und Schaumkraft aus. Sie gehören zur Gruppe der nichtionogenen

Netzmittel, deren Moleküle hydrophile Gruppen und ein lipophiles Ende besitzen. Sie sind gut wasserlöslich.

Über eine Reihe pharmakologischer Eigenschaften von Do R 9, Do R 9/R 2, Do R 9/R 3 und anderer Fraktionen, aber auch weiterer Alkylpolyäthylenoxydäther berichteten Soehring u. Mitarb. Die am meisten hervortretenden Eigenschaften sind die lokalanaesthetische Wirksamkeit an der Hornhaut und an Nervenstämmen (Becher u. Soehring; Stellmach, Schroeder u. Soehring; Siems u. Soehring; Soehring, Frahm u. Mletzko; Schulz, Harz u. Soehring; Soehring, Dass u. Stave), die recht geringe akute und subchronische Toxicität (Soehring, Scriba, Frahm u. Zöllner), die fehlende Einwirkung auf die Gerinnungszeit in vivo (Soehring u. Nasemann) und im Hinblick auf die oberflächenaktiven Eigenschaften ein hämolytischer Einfluß auf tierische und menschliche Erythrocyten in vitro (Soehring u. Nasemann sowie Schulz, Madaus u. Soehring).

Unsere *eigenen Untersuchungen* in dieser Arbeit betrafen:

1. Die Beeinflussung der Impulsaktivität an „normal" tätigen, d. h. chemisch nicht sensibilisierten Lungendehnungsreceptoren während künstlicher Beatmung,

2. die Aufhebung der durch größere Veratringaben (100 $\gamma$/kg i.v.) herbeigeführten Sensibilisierung und kontinuierlichen Impulstätigkeit von Lungen- und Herzreceptoren, und

3. die Blockadewirkung gegenüber kleinen Testdosen von Veratrin (20 $\gamma$/kg i.v.), die zu einer kurzdauernden, aber sehr deutlichen Verstärkung der Impulsaussendung führen.

## Methode.

Wir benutzten in einigen Fällen Katzen, sonst hauptsächlich das Meerschweinchen (Urethannarkose). Für den Nachweis der endoanaesthetischen Wirkung auf die Lungendehnungsreceptoren genügte die Ableitung der Aktionsströme (AS) vom peripheren Halsvagusstumpf. Nähere methodische Einzelheiten finden sich bei Zipf u. Miestereck, bei Kreppel, sowie bei Kreppel u. Zipf. Die elektrophysiologische Registrierung der Aktionsströme und des EKG war die gleiche wie früher. In weiteren Untersuchungen an der Katze prüften wir auch die Wirkung gegenüber Herzreceptoren.

## Versuchsergebnisse.

### *I. Wirkung auf normal tätige Lungenausdehnungsreceptoren.*

Die intravenöse, endoanaesthetische Wirkung von 5 mg/kg Do R 9/R 3 auf „*normal*" *tätige*, chemisch nicht sensibilisierte *Lungendehnungsreceptoren* des Meerschweinchens besteht in einer *Dämpfung der Impulsamplituden*, einer *Verkürzung der Dauer der inspiratorischen Impulsaussendung* („Spindeln") und einer Verlängerung der „Zwischenstrecke". Der Effekt ist noch nach 1 Std vorhanden.

Gegenüber der Wirkung mit anderen Lokalanästhetica (Endoanaesthetica) lassen sich folgende Unterschiede feststellen:

1. Die endoanaesthetische Wirkung setzt etwas später ein, etwa innerhalb 2—3 min.

2. Die Impulsdämpfung ist stärker.

3. Die Wirkungsdauer ist ganz erheblich verlängert.

Wir haben diesen endoanaesthetischen Effekt für Do R 9/R 3 20mal an 13, für Do R 9/R 2 8mal an 3 und für Do R 9 10mal an 5 Meerschweinchen nachgewiesen. Er ist z. B. in der Abb. 4 abzulesen. Die wirksame i.v.-Grenzdosis lag für Do R 9/R 3 und Do R 9/R 2 bei 1 mg/kg. Die *Wirkungsdauer* lief der Dosierung parallel. Sie betrug bei 2—3 mg/kg etwa 10—30 min, bei 4—10 mg/kg 30—120 min. Bemerkenswert war die Tatsache, daß kurz nach der Injektion *keine initiale Erregungsphase* an den sensiblen Receptoren zum Vorschein kam.

Eine geringe und vor allem flüchtige Bradykardie ließ sich erst ab 10 mg/kg in größeren Reihenuntersuchungen nachweisen. Zum Herzstillstand kam es erst bei 30 mg/kg Do R 9/R 3 i.v. Angesichts dieser verhältnismäßig geringen Herztoxizität konnten wir auch die Frage prüfen, ob es durch i.v.-Injektion grundsätzlich möglich ist, die Impulstätigkeit aller Lungendehnungsreceptoren noch stärker oder sogar völlig auszuschalten. (Über ähnliche Versuche an Herzreceptoren besitzen wir noch kein Versuchsmaterial.) Die Abb. 1 gibt einen solchen Versuch wieder. Durch die höhere Dosis von 15 mg/kg Do R 9 i.v. ließ sich praktisch eine fast völlige Endoanaesthesie der Lungen herbeiführen. Unter zunehmender Erniedrigung der Impulsamplituden und Verschmälerung der „Inspirationsspindeln" wurde schon 4—6 min nach der i.v.-Injektion ein Zustand erreicht, in dem die Lungendehnung den Zentren nur noch in geringem Grade gemeldet werden konnte. Die Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren ist noch nach 90 min deutlich zu erkennen (Abb. 1d).

In einem weiteren Versuch mit 30 mg/kg Do R 9/R 3 ließ sich eine totale Endoanaesthesie der Lungen herbeiführen, allerdings unter vorübergehender Schädigung des EKG bis zum fast völligen Herzstillstand. Diese primäre toxische EKG-Beeinflussung war zwar sehr erheblich, aber bis auf eine Bradykardie schon nach 6 min überwunden. Erstaunlich war das spätere Bild, in dem bei wieder erholtem EKG die Impulstätigkeit der Lunge völlig eingestellt war. Sie begann erst nach etwa 45 min wieder zurückzukehren. Es läßt sich hierbei mit gutem Recht vom Zustand einer „pharmakodynamischen Durchschneidung der Lungenvagusnerven" sprechen. Dieser Wegfall der nervösen Afferenzen im Lungenvagus (sicherlich auch in anderen Nerven) kann nicht ohne Bedeutung für den Tonus und die Aktivität der Atmungszentren und damit für den entstehenden Atemtyp des Vergiftungsbildes sein. Auch die exspiratorische Zwischenstrecke wurde erniedrigt, in der von Anfang an nicht nur die Impulsaktivität der entblähten Lunge enthalten war, sondern auch Afferenzen vom Herzen und Depressorsystem vermutet werden können.

*II. Antiveratrinwirkung an Lungendehnungs- und Herzdehnungsreceptoren.*

Bei der *Prüfung der Antiveratrinwirkung* konnten wir den gleichen günstigen endoanaesthetischen Einfluß feststellen. Zwei Verfahren wurden dabei benutzt:

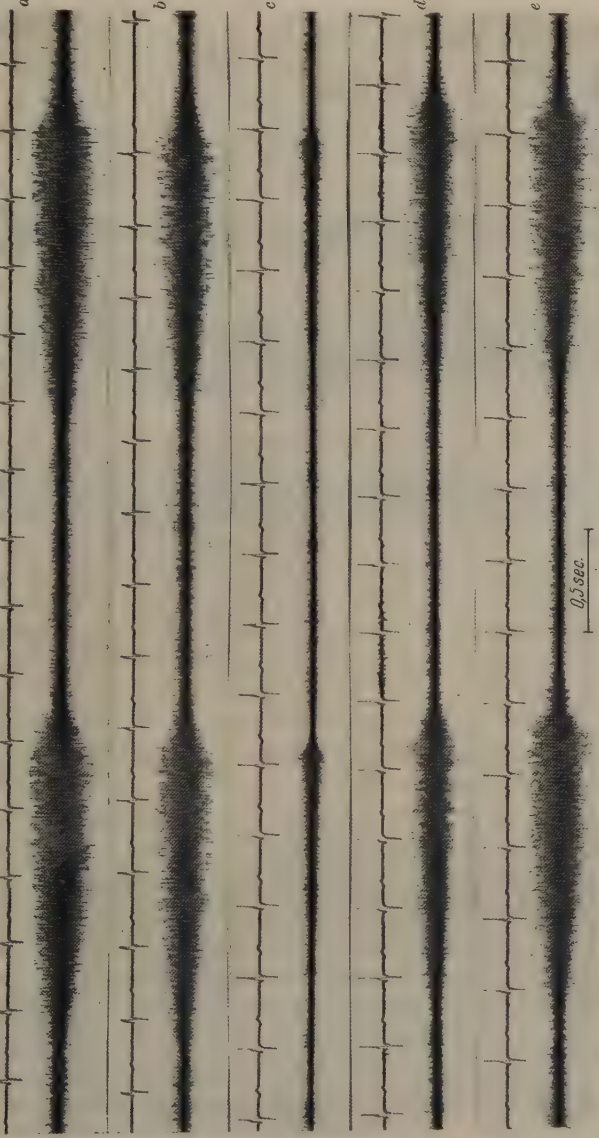



Abb. 1. Meerschweinchen, 420 g, weiblich. Urethannarkose intraperitoneal. Künstliche Beatmung. Impulstätigkeit der Lungendehnungsreceptoren, abgeleitet vom rechten peripheren Halsvagusstumpf (untere Kurve). EKG (obere Kurve). *a* Normale Impulstätigkeit. *b* Sofort nach 15 mg/kg Do R 9 i.v. *c* 30 min nach *b*. *d* 90 min nach *b*. *e* 120 min nach *b* (Ausgangslage wieder erreicht)

1. Die *Aufhebung der kontinuierlichen Impulsausdehnung nach hohen Veratringaben* (100 $\gamma$/kg i.v.). Sie trat ab 1 mg/kg Do R 9/R 3 oder

Do R 9/R 2 i.v., also bei der gleichen *Grenzdosis* wie bei den normaltätigen *Lungendehnungsreceptoren* in Erscheinung. An Lungendehnungsreceptoren wurde dieser „kurative" endoanaesthetische Einfluß für Do R 9/R 3 8mal an 5, für Do R 9/R 2 3mal an 5, für Do R 9 2mal an 2 Meerschweinchen nachgewiesen. Die veratrinbedingte Dauerentladung verschwand jedesmal vollständig. Die Abb. 2 ist ein Beispiel dafür.

Die Beseitigung der veratrinbedingten Dauerimpulse an vorhofsynchron arbeitenden *Herzdehnungsreceptoren* wurde, wie in unseren

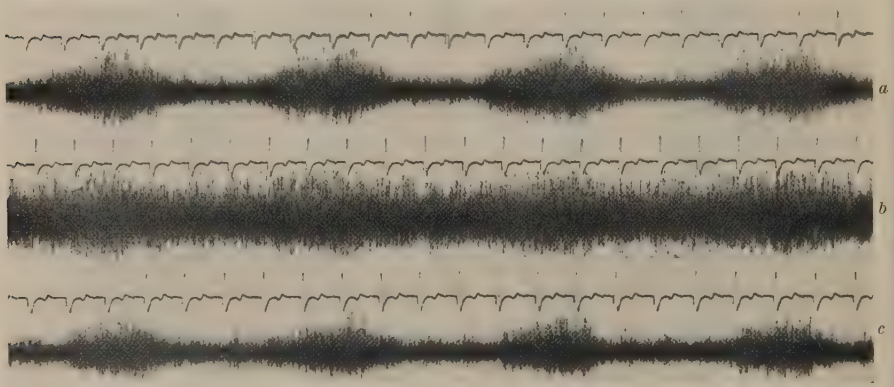



Abb. 2. Meerschweinchen, 600 g, männlich. Urethannarkose intraperitoneal. Künstliche Beatmung. Impulstätigkeit der Lungendehnungsreceptoren, abgeleitet vom linken peripheren Halsvagusstumpf (untere Kurve). EKG (obere Kurve). *a* Normale Impulstätigkeit. *b* Sofort nach 100 $\gamma$/kg Veratrin sulf. i.v. *c* Sofort nach 5 mg/kg Do R 9 i.v. ($^1/_2$ min nach *b*).

früheren Arbeiten, an freigelegten Herzvagusfasern der Katze 3mal nachgewiesen. Die Abb. 3 gibt die deutliche Antiveratrinwirkung von 5 mg/kg Do R 9/R 3 wieder. Die kontinuierliche Impulsentladung verschwand sofort und kam innerhalb der weiteren Beobachtungsdauer nicht wieder zum Vorschein.

2. Die *protektive Wirkung der Do R 9-Stoffe gegenüber kleineren i.v.-Testgaben von 20 $\gamma$/kg Veratrinsulfat* war gut geeignet, ihre Wirkungsdauer an Lungendehnungsreceptoren annähernd zu bestimmen. Die Testdosis Veratrin wurde vor und in bestimmten Abständen nach Verabreichung der Do R 9-Stoffe gegeben, und zwar bis zum Wiedererscheinen der Veratrindauerimpulse. Durch Vorversuche hatten wir uns davon überzeugt, daß die Veratrintestdosis bei wiederholter Injektion am Meerschweinchen nicht zur „Tachyphylaxie" führte. Die blockierende Wirkung von Do R 9/R 3 konnte von uns 9mal an 7, von Do R 9/R 2 1mal an 1 und von Do R 9 6mal an 4 Meerschweinchen festgestellt werden. Die endoanaesthetische *Grenzdosis* der beiden Fraktionen lag mit Sicherheit bei 1 mg/kg i.v. Mit steigender Dosis nahm auch hier die *Wirkungsdauer* zu: bei 2 und 2,5 mg/kg etwa 10 min, bei 5 und 10 mg/kg 30 min

und länger. Die Abb. 4 kann als typisches Versuchsbeispiel gelten. Die volle Blockadedauer betrug in diesem Versuch etwa 25 min. Erst in der 30. min kam der Veratrineffekt wieder zum Vorschein (Abb. 4e). Man kann deutlich erkennen, daß auch die Normalimpulse mehr als 19 min lang (Abb. 4d) partiell gedämpft wurden.

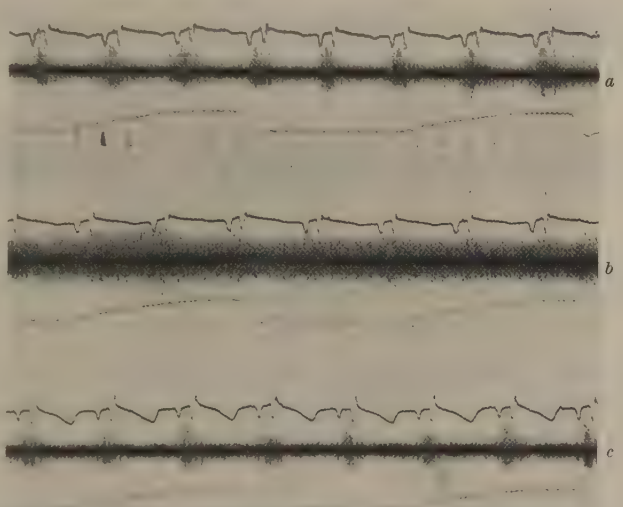



Abb. 3. Kurative Wirkung von Do R 9/R 3 i.v. gegenüber der veratrinbedingten kontinuierlichen Impulstätigkeit in einem hohen afferenten Herzvagusast. Katze, weiblich, 2,5 kg. Chloralose-Urethannarkose. Künstliche Beatmung (untere Kurve). *a* Impulstätigkeit vorher (vorhofsynchron). *b* Sofort nach 100 $\gamma$/kg Veratrin. sulf. i.v. *c* Sofort nach 5 mg/kg Do R 9/R 3 i.v.

## Besprechung.

In Do R 9/R 3 liegt ein Stoff vor uns, der zum ersten Male zuverlässig lange endoanaesthetische Wirkungen an normaltätigen oder chemisch sensibilisierten Lungen- und Herzreceptoren ausübt.

Soehring u. Mitarb. haben inzwischen auch die Antiveratrinwirkung des Do R 9/R 3 am Bezold-Jarisch-Reflex von Katzen nachgewiesen, die, analog der Wirkung der Lokalanaesthetica, als endoanaesthetische Wirkung gegen die sensibilisierten Chemoreceptoren, besonders der linken Herzkammer, gedeutet werden kann. Unser Stoff wirkt so viel stärker und länger endoanaesthetisch als die bisher bekannten Lokalanaesthetica vom „anelektrotonischen" Typ, daß er zweifellos einen Fortschritt in Richtung einer lange anhaltenden Dämpfung bzw. Ausschaltung innerer sensibler Receptoren darstellt. Seine Wirkung beträgt je nach Dosis das etwa 10—30fache derjenigen des Procains. Diesem Ergebnis entspricht die von Soehring, Frahm u. Mletzko gemachte Feststellung, daß Do R 9 auch äußerlich an der Hornhaut erheblich länger lokalanaesthetisch wirkt als sogar Pantocain, und intracutan viel länger als Procain.

Die Do R 9-Stoffe sind, physikalisch-chemisch gesehen, Körper völlig anderen Typs als die bisher bekannten Lokalanaesthetica. Soehring, Dass u. Stave konnten zeigen, daß sie in bestimmten Konzentrationsbereichen langsam eine Kontraktur

des isolierten Rattenzwerchfells herbeiführen und auch bei häufigem Badwechsel nur schwer auszuwaschen sind. Diese lange Haftdauer und schlechte Auswaschbarkeit ist auch bei anderen oberflächenaktiven Körpern zu finden, besonders bei Saponinen, bei Viscotoxin und Veratrin. Wir haben von vornherein an eine Wirkungsgemeinschaft mit diesen und ähnlichen Stoffen gedacht, zumal die Dodecyl-

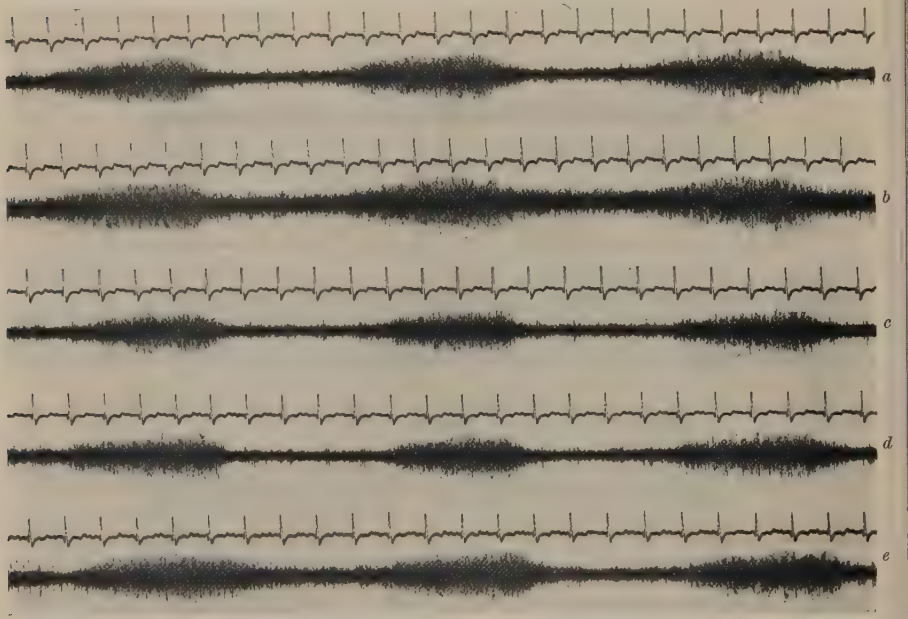



Abb. 4. Protektive Wirkung von Do R 9/R 3 an Lungendehnungsreceptoren gegenüber kleinen i.v.-Veratringaben. Meerschweinchen. Sonstiges siehe bei Abb. 1. *a* Vorher. *b* Sofort nach 20 $\gamma$/kg Veratrin sulf. i.v. (gesteigerte Impulstätigkeit). *c* 5 min nach 5 mg/kg Do R 9/R 3 i.v. *d* 20 $\gamma$/kg Veratrin. sulf. 19 min nach *c*. *e* 20 $\gamma$/kg Veratrin. sulf. 30 min nach *c*.

polyäthylenoxydäther außer der Kontraktur am quergestreiften Muskel auch Hämolyse in vitro und bei Konzentrationen ab 0,5% Reizwirkungen in der Haut und an Schleimhäuten ausüben.

Wir können zeigen (Zipf, Kreppel u. Wetzels), daß die Do R 9-Stoffe einen Sonderfall der Endoanaesthesia katelectrotonica bewirken. Das zu erwartende Sensibilisierungsstadium an inneren sensiblen Receptoren tritt bei ihnen so rudimentär auf, daß im angewandten Dosenbereich keine störenden Reizwirkungen (z. B. an den Lungendehnungsreceptoren) nachgewiesen werden konnten. Die depolarisierende Änderung pro Zeiteinheit ist zu gering.

Die beiden Fraktionen Do R 9/R 3 und Do R 9/R 2 können fast als identisch hinsichtlich ihrer endoanaesthetischen Wirkungsstärke, aber auch ihrer Toxicität an der Maus angesehen werden, so daß kleinere Unterschiede in der „Reinheit" der Fraktionen bei der Molekulardestillation nicht ins Gewicht fallen dürften.

**Zusammenfassung.**

An künstlich beatmeten Meerschweinchen in Urethannarkose zeigten Dodecyl-Polyäthylenoxydäther, i.v. verabreicht, langanhaltende endoanaesthetische Wirkungen. Normal erregte Lungendehnungsreceptoren konnten in ihrer Impulsaktivität, je nach Dosis, partiell oder total gehemmt werden. Die Veratrin-bedingte Dauerentladung ließ sich sofort beseitigen oder durch Vorausgabe der Stoffe blockieren. Die Aufhebung der Veratrinwirkung konnte auch gegenüber der Veratrinentladung von Herzdehnungsreceptoren an der Katze gezeigt werden. Die Wirkung setzte etwas später ein als bei Procain, die Wirkungsdauer betrug das 10—30fache. Die i.v.-Grenzdosis lag tiefer als bei Procain.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung dieser Arbeit.

**Literatur.**

Becher, F., u. Kl. Soehring: Dtsch Z. Nervenheilk. **164**, 381 (1950). — Kreppel, E.: Inaug.-Diss., Bonn, Pharmakol. Inst. 1953. — Kreppel, E., et H. F. Zipf: Arch. internat. Pharmacodynamie **101**, 279 (1955) — Schulz, K. H., G. Madaus et Kl. Soehring: Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 100 (1951). — Schulz, K. H., A. Harz u. Kl. Soehring: Klin. Wschr. **1952**, 663. — Ärztl. Forsch. **7**, I/92 (1953). — Siems, K. J., u. Kl. Soehring: Arzneimittel-Forsch. **2**, 109 (1952). — Soehring, Kl., K. Scriba, M. Frahm et G. Zöllner: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 301 (1951). — Soehring, Kl., H. Dass et H. Stave: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 365 (1952). — Soehring, Kl., et Th. Nasemann: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 96 (1952). — Soehring, Kl., M. Frahm et K. Mletzko: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 112 (1952). — Stellmach, R., E. Schroeder et Kl. Soehring: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 380 (1952). — Zipf, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 113 (1953). — Tagungsber. d. 19. Tag. d. Dtsch. Pharmakol. Ges. 1953 in Göttingen. — Zipf, H. F., u. H. Miestereck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 456, 472 (1953). — Zipf, H. F.: Klin. Wschr. **1953**, 97. — Zipf, H. F.: Dtsch. Wschr. **1953**, 1587. — Zipf, H. F., E. Kreppel u. E. Wetzels: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 348 (1955).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Bln.-Dahlem, Inst. f. Veterinär-Pharmakologie u. exper. Pathologie d. Freien Univ., Bitterstr. 14—16.

Dr. E. Kreppel, Bonn, Pharmakologisches Institut, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 348—362 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

# Untersuchungen zur Definition einer katelektrotonischen Form der Endoanaesthesie.

Von
H. F. Zipf, E. Kreppel und E. Wetzels.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 24. März 1955.)*

In der vorhergehenden Mitteilung haben wir über eine Stoffgruppe berichten können (Zipf u. Kreppel), die eine sehr deutliche endoanaesthetische Wirkung auf innere sensible Receptoren ausübte, über Dodecyl-polyäthylenoxydäther. Nicht nur das Gemisch Do R 9, sondern vor allem zwei molekulardestillierte Fraktionen Do R 9/R 3 und Do R 9/R 2 erwiesen sich als wirksam. Alle Stoffe sind Netzmittel von außerordentlicher Oberflächenaktivität, Schaumkraft und Haftfähigkeit. Bringt man höhere Konzentrationen äußerlich auf die Schleimhäute (z. B. des Auges) oder unter die Haut, dann erweist sich Do R 9/R 3 ab 0,5% aufwärts als typisches Anaestheticum dolorosum. Dem anfänglich schmerzhaften Stadium folgt ein Zustand des reversiblen Verlustes der Nervenerregbarkeit, d. h. der Anaesthesie.

Viele physikalische wie chemische Eingriffe und Pharmaka verursachen eine „Anaesthesia dolorosa": destilliertes Wasser und hypotone Lösungen, Ammoniak, Veratrin (Boehm, S. 249, Weigmann), Aconitin (Boehm, S. 283), und nach den Untersuchungen von Gross eine ganze Reihe von Narkotica und Hypnotica, wie z. B. Chloroform, Chloralhydrat, Paraldehyd, Amylenhydrat, Äthylpropionat, Amylacetat, Hypnon, Phenylurethan und Äthylurethan.

Die Folge Schmerz—Anaesthesie findet sich auch bei verschiedenen Stoffen, die zum Typ der Netzmittel gehören, und die oberflächenaktiven, sowie schäumenden Charakter besitzen. Zu ihrer schmerzerzeugenden Wirkung in Haut und Schleimhaut tritt eine entzündungserregende und hämolytische Wirksamkeit. Sekundär stellt sich Anaesthesie ein. Beispiele hierfür sind das 3-, 6-Diaminocholestan (Stückradt) und die Cholestonsulfosäure (Heinemann). Ein saponinartiger Wirkungscharakter ist unverkennbar.

Eine Anaesthesia dolorosa erfolgt auch durch Kaliumionen selbst, die einen depolarisierenden Einfluß besitzen (Rhode). Der zweiphasige Wirkungscharakter der Asphyxie und der atmungshemmenden Schmerzgifte kann gleichfalls unter dem Gesichtspunkt der Anaesthesia dolorosa betrachtet werden, denn er zeigt sich durch zunehmende Depolarisation zunächst als gesteigerte Erregbarkeit, in der unterschwellige Reize rasch schwellenartig werden und von einem kritischen Grad an als eine Blockierung der Erregungsimpulse (Fleckenstein).

Es kann angenommen werden, daß die Reizphase und das anaesthetische Endstadium, sowie die Endoanaesthesie nur verschiedene Grade im Wirkungsablauf der Lokalanaesthetica dolorosa darstellen, und daß jeweils der gleiche Wirkungsmechanismus zugrunde liegt, nämlich eine fortschreitende Depolarisation und eine katelektrotonische Erregbarkeitshemmung der Zellmembran. Allerdings müssen sich bei kleinen lokalen Konzentrationen oder nach intravenösen Gaben die Änderungen an der Membran bzw. an anderen Strukturflächen so kleinstufig vollziehen, daß eine gesteigerte initiale Impulstätigkeit der Receptoren nicht mehr zustande kommt.

Im Laufe unserer Untersuchungen fanden wir Stoffe, die an Lungendehnungsreceptoren ein ähnliches Wirkungsbild lieferten, wie wir es an den Schmerzreceptoren der Haut und Schleimhaut als Anaesthesia dolorosa kennen, d. h. den diphasischen Ablauf von Erregbarkeitssteigerung und Erregbarkeitshemmung. Über die elektrophysiologischen Untersuchungen mit zwei solcher Substanzen, B 76 und B 77, wollen wir zuerst berichten.

Vergleichsweise haben wir auch das Alkaloidgemisch Veratrin (Veratridin + Cevadin) sowie das Veratrumalkaloid Germitrin herangezogen. Es ließen sich damit an Lungendehnungsreceptoren wenigstens partiell endoanaesthetische Wirkungen erzielen, wie durch B 76 und B 77.

Wir mußten aus diesen Ergebnissen schließen, daß Do R 9, B 76 und B 77 der gemeinsamen Gruppe der „Lokalanaesthetica katelectrotonica" angehören und in einem gegensätzlichen Verhältnis zur Gruppe der „Lokalanaesthetica anelectrotonica" und zum Anelectrotonus selbst stehen. Deshalb prüften wir im Rahmen dieser Arbeit auch den antagonistischen Einfluß des „Anelektrotonicums" Procain auf die durch diese Stoffe gesetzten Wirkungen am quergestreiften Muskel und an menschlichen Erythrocyten.

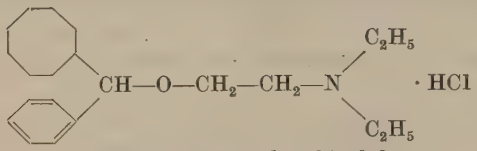
## Versuchsergebnisse.

### *I. Sensibilisierung und Desensibilisierung von Lungendehnungsreceptoren durch B 76 und B 77.*

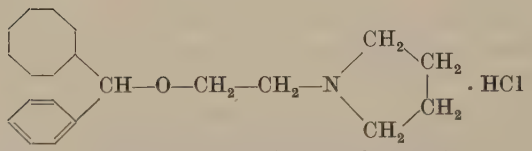
Im Laufe unserer Versuche mit Netzmitteln fielen uns zwei oberflächenaktive, schäumende Stoffe durch ihre diphasische Wirkung auf Lungendehnungsreceptoren auf. Es handelte sich um *Cyclooctyl-phenylcarbinol-β-diäthylaminoäthyläther-HCl* (= B 76) und um *Cyclooctyl-phenylcarbinol-β-äthyl-pyrrolidin-HCl* (= B 77), zwei Körper, die uns freundlicherweise von der BASF, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt wurden.

Beide Stoffe erwiesen sich, wie Do R 9/R 3, äußerlich in der Haut (Quaddelmethode) und im Kaninchenauge als starke und typische Anaesthetica dolorosa. Im niederen Konzentrationsbereich kam es am Auge mit B 76 anfänglich zu schwachen Reizerscheinungen, dem ein Stadium der Anaesthesie folgte. Im mittleren zu einer stärker betonten Anaesthesia dolorosa, im höheren Konzentrations-

bereich machte die Reizwirkung (Hyperämie und Schwellung der Bindehäute, Lidspasmus) den Nachweis der Hornhautanaesthesie unmöglich. Auch intracutan war eine Reizphase vor der sekundären Anaesthesie zu beobachten. Bei B 77 kam es am Auge zu einer weniger ausgeprägten Reizung. Das diphasische Bild der Anaesthesia dolorosa trat jeoch noch deutlich in Erscheinung. Intracutan war bei anaesthetisch vollwirksamen Konzentrationen keine Reizwirkung mehr vorhanden. Beide Stoffe führten in vitro ab 1 : 20000 zu einer Hämolyse menschlicher Erythrocyten.




Cyclooctyl-phenyl-carbinol-$\beta$-diäthyl-aminoäthyl-äther = B 76




Cyclooctyl-phenyl-carbinol-$\beta$-äthyl-pyrrolidin-HCl = B 77

Unsere Vermutungen gingen dahin, daß es durch Verabreichung intravenöser Dosen von B 76 und B 77 möglich sein mußte, an inneren sensiblen Receptoren einen Zustand einzustellen, der der äußerlichen Anaesthesia dolorosa ähnlich ist. Wir prüften deshalb den Einfluß von *B 77* auf die Impulstätigkeit der *Lungendehnungsreceptoren des Meerschweinchens* unter künstlicher Beatmung (Methodik siehe bei Kreppel u. Zipf). Im Versuch der Abb. 1 wurden 2 mg/kg i.v. gegeben. Sofort nach der Injektion herrschte ein Aktionsstrombild vor, daß von einer Veratrindauerentladung nicht zu unterscheiden war. Diese veratrinartige Anfangserregung machte schon nach etwa 30 sec einer deutlichen *partiellen Endoanaesthesie* Platz. An 4 Meerschweinchen ließ sich 5mal diese Wirkung einstellen. Das Bild glich völlig der Wirkung von Procain (Dämpfung der Impulshöhen während der Inspiration und der Exspiration, Verkürzung der „Spindeln", Verlängerung der Zwischenstrecken). Der Effekt bildete sich nach etwa $3^1/_2$ min am stärksten aus. Nach 75 min war die partielle Endoanaesthesie abgeklungen und das Ausgangsbild der Impulstätigkeit wieder erreicht. *Das gleiche diphasische Wirkungsbild* der anfänglichen Erregung, später partiellen Anaesthesie an den Lungendehnungsreceptoren konnten wir für B 76 8mal an 5 Meerschweinchen nachweisen.

Wir sahen also in einem bestimmten Versuchsabschnitt die zwei Kennzeichen der Anaesthesia dolorosa aufeinander folgen, *Sensibilisie-*

*rung und Desensibilisierung* der Receptoren, nach außen als gesteigerte und herabgesetzte Impulsaussendung nachweisbar. Der Begriff Anaesthesia dolorosa konnte nach dem Ergebnis dieser Versuche also allgemeiner aufgefaßt werden, da das diphasische Erscheinungsbild nicht nur an Schmerzreceptoren der Haut, sondern auch an den sensiblen Dehnungsreceptoren der Lunge zustande kommt.

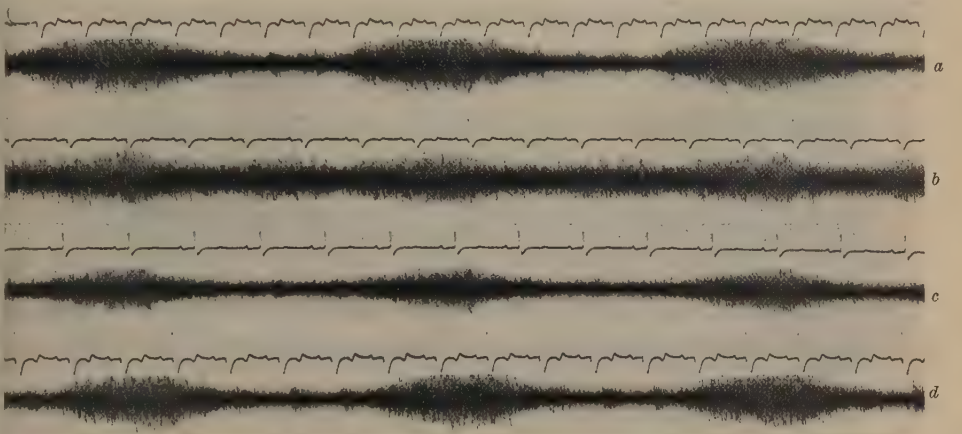



Abb. 1. Sensibilisierung und später partielle Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren durch B 77. Meerschweinchen, männlich, 400 g. Urethannarkose intraperitoneal. Künstliche Beatmung. Afferente Impulstätigkeit im rechten peripheren Halsvagusstumpf (untere Kurve) und EKG (obere Kurve). *a* Normale atemsynchrone Impulstätigkeit. *b* „Veratrinartige" Dauerentladung sofort nach 2 mg/kg B 77 i.v. *c* Partielle Endoanaesthesie, $3^1/_2$ min nach *b*. *d* 75 min nach *b*.

Man muß bei der Beurteilung von Versuchen an Dehnungsreceptoren berücksichtigen, daß sie von allen Receptorenarten am schwersten auszuschalten sind. Eine totale Endoanaesthesie läßt sich nur durch Stoffe herbeiführen, die die lebenswichtigen Organfunktionen nicht zu stark schädigen, z. B. durch die Dodecylpolyäthylenoxydäther Do R 9/R 2 oder Do R 9/R 3. Bei der gewählten Versuchstechnik kommt die Impulstätigkeit von Chemo- bzw. Schmerzreceptoren überhaupt nicht zur Darstellung. Dies ist deswegen bedauerlich, weil zu erwarten ist, daß gerade sie besonders leicht über die anfängliche Erregungsphase hinweg ausgeschaltet werden können, in Analogie zu den Verhältnissen bei der Lokalanaesthesie.

### *II. Partielle Endoanaesthesie an Lungendehnungsreceptoren durch Veratrumalkaloide.*

Selbst bei Stoffen, in deren Wirkungsbild die Reizkomponente besonders in die Augen springt, läßt sich unter geeigneten Versuchsverhältnissen unsere besondere Endoanaesthesieform nachweisen. Nach intravenösen Dosen des Alkaloidgemisches Veratrin (Veratridin + Cevadin) kommt es bekanntlich zum Bezold-Jarisch-Reflex (BJR), der von den Chemoreceptoren aus, vor allem der linken Herzkammer, zu Blutdruck-

abfall und Pulsverlangsamung führt. Wiederholte intravenöse Injektionen bewirkten eine sogenannte „Tachyphylaxie", d. h., gleich hohe bzw. höhere Dosen lösen schließlich keinen BJR mehr aus.

Es erschien uns wahrscheinlich, daß hierbei ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wie bei der Anaesthesia „dolorosa" vorlag. Wir konnten dies direkt nachweisen. Der BJR ist ja nicht der einzige Fall, sondern nur ein Sonderbeispiel für die Sensibilisierung innerer Receptoren durch Veratrin. Auch Mechanoreceptoren, wie z. B. die Dehnungsreceptoren

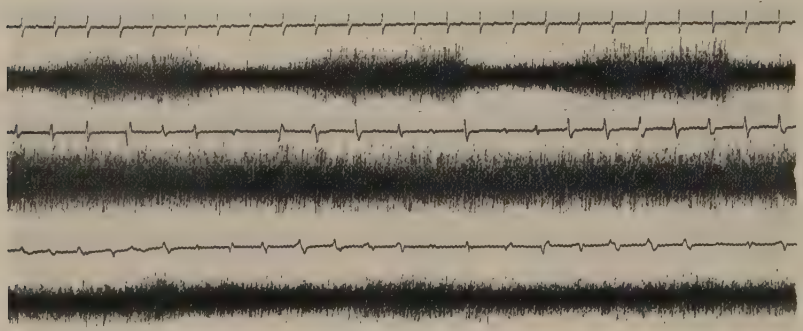



Abb. 2. Sensibilisierung und später Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren durch große und wiederholte i.v. Gaben von Veratrinsulfat. Meerschweinchen, männlich, 500 g. Urethannarkose intraperitoneal. Künstliche Beatmung. Afferente Impulstätigkeit im peripheren rechten Halsvagusstumpf (untere Kurve) und EKG (obere Kurve). *a* Normale atemsynchrone Impulstätigkeit. *b* Sofort nach der ersten i.v. Gabe von 1000 $\gamma$/kg Veratrinsulfat. *c* Sofort nach der zweiten Veratringabe von 1000 $\gamma$/kg i.v. (3 min nach *b*).

der Lunge und des Herzens, werden gegenüber ihren propioceptiven Reizen sensibilisiert und antworten dann mit kontinuierlichen Impulsaussendungen. Wenn man über dieses initiale Stadium der Dauerentladung hinaus weitere Mengen Veratrin zuführt, dann kommt ein Bild der *partiellen Endoanaesthesie* zustande (Abb. 2), das durchaus der endoanaesthetischen Procainwirkung gleicht. Die Impulstätigkeit wird immer geringer, die Amplituden niedriger, die „Spindeln" verschwinden schließlich fast ganz. Die Wirkung hält aber erheblich länger an als bei Procain. Das gesamte diphasische Bild ist prinzipiell dem von B 77 gleichzusetzen, lediglich die Sensibilisierungsphase steht bei Veratrin zeitlich stärker im Vordergrund. Wir haben diese Endoanaesthesia „dolorosa" 10mal an 6 Meerschweinchen nachgewiesen.

In einem Stichversuch konnten wir die partielle Endoanaesthesie auch mit *Germitrin*, einem Esteralkaloid von Veratrum viride einstellen. Ihr lief die übliche Sensibilisierungsphase in Form einer Dauerentladung von Lungenimpulsen voraus. Germitrin A und B führt wie Veratridin, Cevadin, Germerin, Germidin, Germitetrin und Protoveratrin zu Bradykardie und Blutdrucksenkung (siehe bei Rothlin u. Cerletti).

Es handelt sich um eine völlig andere Art von Endoanaesthesie, als wir sie von den bisher bekannten Lokalanaesthetica vom Procaintypus

kennen. Wir können sie auch als eine *Depolarisationsanaesthesie* bezeichnen. Der Verlust der Receptorenerregbarkeit muß der Ausdruck einer fortgeschrittenen Depolarisation und Hemmung des Stoffwechsels sein. Sie entspricht dem Typ der katelektrotonischen Erregbarkeitshemmung (Fleckenstein). Auch die „Tachyphylaxie" bei Blutdruckversuchen ist wohl unter diesen Begriff einzuordnen. Für diese Auffassung sprechen auch sonstige Varatrinwirkungen: Die Kontraktur des quergestreiften Muskels als energiearmer Zustand, die schnelle Adaptation der Muskelspindeln des belasteten Froschmuskels (Jarisch u. Zottermann).

### *III. Der antagonistische Einfluß von Procain gegenüber der kontrakturerzeugenden Wirkung von B 76 und Do R 9/R 3 am isolierten M. gastrocnemius des Frosches.*

Soehring, Dass u. Stave beobachteten während der rhythmischen elektrischen Reizung des isolierten Rattenzwerchfells vom N. phrenicus aus unter Do R 9/R 3 einen langsam eintretenden Tonusanstieg und eine deutliche Kontraktur. Dieser Effekt ließ sich nur langsam und schwer durch Auswaschen wieder beheben. Trotz dieser Kontraktur konnte sich der Muskel bei direkter elektrischer Reizung noch weiter kontrahieren. Die Untersucher glauben, daß es sich bei Einwirkung von Do R 9/R 3 nicht um einen einfachen passiven „physikalisch-chemischen" Vorgang im Sinne einer Gerbwirkung handelt, sondern, daß „biologische" Eigenschaften erhalten bleiben.

Unsere eigenen Untersuchungen am Gastrocnemius des Frosches sollten den Umfang, die Art und den Entstehungsmechanismus der durch Do R 9/R 3 und B 76 hervorgerufenen Kontraktur, sowie die Möglichkeit einer Beeinflussung durch Procain ermitteln.

*Methodik.* Präparation beider MM. gastrocnemii von männlichen und weiblichen Temporarien. Der eine Muskel wurde 1 Std in 0,6%iger NaCl-Lösung, der andere für die gleiche Zeit in 0,6% NaCl mit 1,0 oder 2,0% Procain-HCl eingelegt. Anschließend wurde die Kontrakturwirkung der gewünschten Konzentration von B 76 oder Do R 9/R 3 (in 0,6% NaCl) geprüft und die eingetretene Verkürzung über einen isotonischen Hebel (Vergrößerung 1 : 7, Belastung 4 g) auf dem Rußkymographion registriert. Die Einwirkungszeit der Kontraktursubstanz betrug 20 min. In den meisten Fällen untersuchten wir dann die direkte elektrische Erregbarkeit des Muskels nach Anlegen zweier Platinelektroden mittels eines Reizgerätes. In anderen Fällen wurde geprüft, ob durch Ersatz der kontraktursubstanzhaltigen NaCl-Lösung durch eine procainhaltige die eingetretene Verkürzung wieder rückgängig gemacht werden konnte. Auch auf die Konsistenz der Muskeln nach dem Versuchsende wurde geachtet.

*B 76.* Die kontrakturerzeugende Wirkung verschiedener Konzentrationen ist in der Tab. 1 zusammengestellt. Sie ist ausgeprägter als die von Do R 9/R 3 (siehe Tab. 2). In dem von uns geprüften Konzentrationsbereich bis 1,0% B 76 konnten wir bei 0,25% den stärksten Verkürzungsgrad, und zwar um ein Viertel der ursprünglichen Muskellänge beobachten. Die Schwelle für eine deutliche Kontrakturwirkung lag bei 0,02%.

Bis zur Konzentration von 0,05% B 76 war der Verlauf der Kontrakturkurve durch einen gleichmäßigen, relativ flachen Anstieg gekenn-

Tabelle 1. *Wirkung von B 76 auf den Froschgastrocnemius ohne Vorbehandlung (normale Schrift) und nach Vorbehandlung mit 1% Procain-HCl (in Kursivschrift).*

| B 76 % | Ausgangslänge mm | Erregungskontraktur | Fasciculäre Zuckungen | Schädigungskontraktur | Gesamtverkürzung nach 20 min in mm | Gesamtverkürzung nach 20 min in % | Elektrische Erregbarkeit nach 20 min |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 31 | + | + | + | 7,7 | 25 | keine |
| | *31* | *keine* | *keine* | + | *6,6* | *21* | *keine* |
| 0,5 | 24 | + | + | + | 5,6 | 23 | keine |
| | *25* | *keine* | *keine* | + | *3,9* | *15* | *keine* |
| 0,25 | 32 | + | + | + | 8,0 | 25 | keine |
| | *32* | *keine* | *keine* | + | *6,3* | *20* | *keine* |
| 0,1 | 30 | (+) | (+) | + | 5,3 | 18 | keine |
| | *31* | *keine* | *keine* | + | *5,6* | *18* | *keine* |
| 0,1 | 30 | + | + | + | 4,9 | 16 | keine |
| | *30* | *keine* | *keine* | + | *5,9* | *17* | *keine* |
| 0,05 | 30 | keine | keine | + | 2,4 | 8 | keine |
| | *31* | *keine* | *keine* | + | *2,0* | *6* | *keine* |
| 0,02 | 38 | keine | keine | (+) | 1,4 | 4 | + |
| | *39* | *keine* | *keine* | (+) | *0,9* | *2* | *keine* |
| 0,01 | 31 | keine | keine | (+) | 0,15 | 0,5 | + |
| | *31* | *keine* | *keine* | (+) | *0,86* | *3* | ((+)) |

zeichnet. Fasciculäre bzw. fibrilläre Zuckungen traten nicht auf. Höhere Konzentrationen lieferten jedoch ein gänzlich anderes Bild: Unter aus-

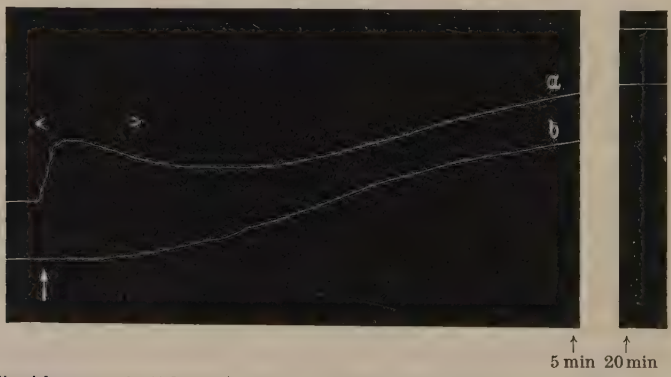



Abb. 3. Einwirkung von 0,1% B 76 ( ↑ ) auf den Froschgastrocnemius. *a* Ohne, *b* nach Vorbehandlung mit 1% Procain-HCl. Unterdrückung der Erregungskontraktur und der fasciculären Zuckungen (〈 〉), nicht aber der Schädigungskontraktur.

geprägten fibrillären und fasciculären Zitterbewegungen kam es zu einer steilen Anfangsverkürzung (Erregungskontraktur) (Abb. 3a). Ihr folgte eine vorübergehende Phase der Erschlaffung, an die sich eine langsam und gleichmäßig zunehmende Kontrakturphase anschloß, die nicht mehr

von Muskelzittern begleitet war und die sich auch in der zunehmenden weißlichen Verfärbung ausdrückte. Dementsprechend war der Kurvenverlauf zweigipflig und erinnerte — abgesehen vom Tempo — an die bekannte Form der Veratrinkontraktur. Der zweite Teil der Kontrakturkurve zeigte die typische Schädigungskontraktur an. Die elektrische Erregbarkeit ging bei Konzentrationen oberhalb 0,02% B 76 völlig verloren.

Unverkennbar war die *Beeinflussung des Kontrakturverlaufes durch 1% Procain*: die Kurve wurde ihrer Zweigipfligkeit beraubt; die *initiale Verkürzung (Erregungskontraktur), das Muskelzittern und das folgende, vorübergehende Erschlaffungsstadium wurden unterdrückt* (Abb. 3b und Tab. 1). Statt dessen zeigte die Kurve von Anfang an einen zunächst mäßig steilen, dann langsam flacher werdenden, ausgeglichenen Verlauf. Die Schädigungskontraktur konnte weder durch eine Vor- noch eine Nachbehandlung mit Procain beseitigt werden.

Auch der Veratrrineffekt am quergestreiften Froschmuskel läßt sich durch Procain und anderen Lokalanaesthetica unterdrücken (Schüller u. Athmer), desgleichen die Coffeinstarre (Schüller). Der Kaliumaustritt aus dem coffein- oder avertinbehandelten Froschmuskel kann durch Vorbehandlung mit Procain fast völlig verhindert werden (Hardt u. Fleckenstein). Die bereits bestehende Coffeinstarre läßt sich (wie bei B 76) nicht mehr beseitigen (Schüller). Die B 76-Schädigung scheint tiefer zu sein da sie, wie gesagt, auch durch Vorbehandlung sich nicht aufhalten läßt.

Bereits aus der Verbindung der initialen Muskelverkürzung mit den Reizerscheinungen an den Fibrillen und Faszikeln konnten wir den Schluß ziehen, daß es sich bei dem Anfangsteil der Verkürzung um eine Erregungskontraktur im Sinne Riessers handelte, während der zweite Teil der Kontraktur als Schädigungskontraktur anzusehen war. Diese Auffassung wurde unterstützt durch die Tatsache, daß der antagonistische Effekt des Procains sich nur auf den Anfangsteil der Verkürzung bezog. Echte Erregungskontrakturen sind an das Vorhandensein der „receptiven Substanz" (Langley) im Bereich der neuromuskulären Endplatte gebunden.

In Anlehnung an einen Hinweis von Neuschlosz haben wir besonders geprüft, ob durch *Abschneiden des proximalen Drittels* des Froschgastrocnemius — das vorwiegend Sitz der neuromuskulären Übertragungsapparate und damit der „receptiven Substanz" ist — Art und Umfang der Kontraktur eine wesentliche Änderung erfahren. Dies ist tatsächlich der Fall: *Die schnell ablaufende initiale Verkürzung wurde verhindert*, nicht jedoch die nachfolgende langsame Kontraktur. Auch das Muskelzittern ließ sich unterdrücken oder wenigstens erheblich vermindern. Die Kontrakturkurve wurde eingipflig und nahm einen gleichmäßigen, regelmäßig ansteigenden Verlauf. Die entsprechenden kontralateralen M. gastrocnemii wurden um ihr distales Drittel gekürzt; sie

verhielten sich wie der normale Muskel. Damit kam die Verletzung des Muskels als solche für die Änderung des Kontrakturverlaufes nicht in Frage. *Bei dem um sein stammnahes Drittel gekürzten Gastrocnemius verläuft die Kontraktur also ebenso (gleichmäßig langsam), wie bei dem mit Procain vorbehandelten Muskel.*

*Do R 9/R 3.* Eine Übersicht über die Muskelwirkungen des Do R 9/R 3 findet sich in der Tab. 2. Mit zunehmender Konzentration steigt im

Tabelle 2. *Wirkung von Do R 9/R 3 auf den Froschgastrocnemius ohne (Normalschrift) und nach (Kursivschrift) Vorbehandlung durch 1% (und 2%) Procain-HCl.*

| Do R 9/R 3 % | Ausgangslänge mm | Erregungskontraktur | Fasciculäre Zuckungen | Schädigungskontraktur | Gesamtverkürzung nach 20 min in mm | Gesamtverkürzung nach 20 min in % | Elektrische Erregbarkeit nach 20 min |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 29 | + | + | keine | 2,7 | 9 | stark herabgesetzt |
| | *30* | *keine* | *keine* | *keine* | *0,3* | *1* | *stark herabgesetzt* |
| 3 | 32 | + | + | keine | 2,9 | 9 | stark herabgesetzt |
| | *32* | *keine* | *keine* | *keine* | *1,1* | *3* | *keine* |
| 2 | 33 | + | + | keine | 3,4 | 10 | — |
| | *33* | *keine* | *keine* | *keine* | *1,0* | *3* | — |
| 2 | 31 | + | + | keine | 3,3 | 11 | — |
| | *31* | *keine* | *keine* | *keine* | *1,6* | *5* | — |
| 1 | 30 | + | + | keine | 2,1 | 7 | — |
| | *30* | *keine* | *keine* | *keine* | *0,5* | *2* | — |
| 0,75 | 33 | + | + | keine | 2,6 | 8 | — |
| | *33* | *keine* | *keine* | *keine* | *1,4* | *4* | — |
| 0,5 | 26 | (+) | + | keine | 0,8 | 3 | — |
| | *27* | *keine* | *keine* | *keine* | *0,45* | *2* | — |
| 0,5 | 28 | keine | (+) | keine | 2,0 | 7 | — |
| | *27* | *keine* | *keine* | *keine* | *1,4* | *5* | — |
| 0,4 | 31 | keine | keine | keine | 0,6 | 2 | + |
| | *30* | (+) | *keine* | *keine* | *1,6* | *5* | *keine* |
| 0,4 | 33 | + | + | keine | 1,3 | 4 | herabgesetzt |
| | *33* | *keine* | *keine* | *keine* | *1,1* | *3* | *stark herabgesetzt* |
| 0,3 | 29 | (+) | (+) | keine | 1,7 | 6 | + |
| | *28* | *keine* | *keine* | *keine* | *0,9* | *3* | *keine* |
| 0,2 | 30 | keine | keine | keine | 1,3 | 4 | + |
| | *32* | *keine* | *keine* | *keine* | *0,7* | *2* | *keine* |
| 0,12 | — | (+) | keine | keine | 1 | — | — |
| | — | *keine* | *keine* | *keine* | *0* | | — |
| 0,05 | — | keine | keine | keine | 0 | — | — |
| | — | . | *keine* | *keine* | *0,7* | | — |

allgemeinen der Grad der Gesamtverkürzung an, doch scheint oberhalb von 2% eine weitere Verstärkung der Kontraktur nicht mehr einzutreten. Die Schwelle liegt etwa bei 0,2% Do R 9/R 3. Im ganzen gesehen waren

die erzielten *Kontrakturgrade gering*. Eine Verkürzung um mehr als ein Neuntel der ursprünglichen Muskellänge wurde weder nach 5 noch nach 20 min festgestellt. Interessant war die Beobachtung des Verlaufes der Kontraktur. Im Konzentrationsbereich unterhalb 0,3% Do R 9/R 3 besaß der Verlauf der Kontrakturkurve einen gleichmäßig und langsam ansteigenden Charakter. Äußerlich sichtbare Reaktionen des Muskels, wie Zitterbewegungen, waren nicht erkennbar. Oberhalb dieser Konzentration aber entwickelte sich zunächst eine steile initiale Verkürzungskurve, die anschließend fast eben verlief (Abb. 4a). Diese Kontrakturphase war von

Abb. 4. Erregungskontraktur durch 2% Do R 9/R 3 am Froschgastrocnemius (*a*). Keine Schädigungskontraktur. Unterdrückung der Erregungskontraktur und der fasciculären Zuckungen (⟨ ⟩) durch Vorbehandlung mit 2% Procain-HCl (*b*).

deutlichen fasciculären und fibrillären Zuckungen begleitet, die 1—4 min anhielten. Keiner der Muskeln ließ nach Versuchsende bei der Betastung eine Änderung seiner Konsistenz erkennen. Eine Schädigungskontraktur trat nicht auf. Das Ausmaß der Verkürzung, die begleitenden Erregungserscheinungen stimmen überein mit der initialen Erregungskontraktur bei B 76. Für diesen Charakter der Muskelverkürzung spricht auch die Tatsache, daß die elektrische Erregbarkeit des Muskels noch vorhanden war, wenngleich die Reizschwelle sich erhöht hatte.

Daß es sich *bei der Muskelverkürzung durch Do R 9/R 3 um eine Erregungskontraktur handelte*, ließ sich wiederum durch *Abtragung der „receptiven Substanz"* im proximalen Teil des Muskels nachweisen (siehe oben). *Die Erregungskontraktur blieb völlig aus.* Da auch die Schädigungskontraktur nicht auftrat, verhielt sich der Muskel praktisch völlig ruhig. *Das Ausmaß der direkten Zellschädigung mußte zum mindesten sehr gering sein.*

Die *antagonistische Wirkung von 1—2% Procain* wirkte sich im gleichen Sinne aus, wie das Abschneiden der „receptiven Substanz". Die Erregungskontraktur samt ihren Begleitzeichen ließ sich völlig unterdrücken (siehe Abb. 4b), jedoch nur bei Vorbehandlung. Ein nachträgliches Procainbad war wirkungslos. Die danach noch sichtbare Form des Kontraktionsablaufes war wesentlich verändert. Sie entsprach derjenigen, die sonst bei nichtvorbehandelten Muskeln bei Konzentrationen

unter 0,3% Do R 9/R 3 eintrat, d. h. der Ablauf der Kontrakturkurve war im ganzen sehr flach, der steilere Anfangsteil fehlte. Fibrilläre und fasciculäre Zuckungen traten nicht mehr auf. Bezüglich Farbe und Konsistenz fand sich kein Unterschied zu den nichtvorbehandelten Muskeln, wohl aber in bezug auf die elektrische Erregbarkeit. In den meisten Fällen war diese völlig aufgehoben, in anderen stark herabgesetzt.

*Zusammengefaßt* können *B 76* und *Do R 9/R 3* hinsichtlich ihrer Wirkung auf den isolierten Muskel folgendermaßen verglichen werden: *Beide Stoffe bewirken durch eine depolarisierende Membranwirkung eine initiale Erregungskontraktur, die durch Vorbehandlung mit Procain unterdrückt werden kann. B 76 führt darüber hinaus durch direkte Störung am Muskeleiweiß zu einer durch Procain nicht beeinflußbaren Schädigungskontraktur. Diese schädliche Wirkung fehlt dem Do R 9/R 3.*

Wir versuchten weiterhin am N. ischiadicus des Frosches die aufhebende Wirkung des Anelektrotonus gegenüber dem Leitungsblock durch B 76, B 77 und Do R 9/R 3 zu zeigen. Dies gelang nicht, da diese Netzmittel sich durch ihre Oberflächenaktivität schnell über Nerv- und Muskeloberfläche verteilten und unspezifische Effekte herbeiführten.

## Besprechung.

Schmerzhafte Reizerscheinungen an Haut- und Schleimhautreceptoren, fasciculäre Teilkontraktionen am Froschgastrocnemius treten bei allen von uns geprüften Stoffen auf. Sie sind die Folge einer Sensibilisierung gegenüber Reizen, die nun überschwellig werden. Es handelt sich um das erste Stadium der sich stetig steigernden Membranauflockerung und Depolarisation. Das Vorhandensein von Schmerz, das „*dolorosa*"-Stadium, d. h. die kontinuierliche Impulsaussendung der betroffenen Chemo-(Schmerz-)receptoren ist der Beweis dafür, daß der Wechselprozeß an der Membran als Depolarisation — Repolarisation zunächst noch regelrecht ablaufen kann, wahrscheinlich in schnellerer und repetierender Weise. Das gleiche gilt grundsätzlich für die primäre Reizphase der sensibilisierten „rezeptiven Substanz" im Muskel.

Dem „Schmerz"-Stadium des sensiblen Receptors folgt das anaesthetische Endstadium. Mit ihm kann das Aufhören des Muskelschwirrens bei der Erregungskontraktur des Froschgastrocnemius verglichen werden. Der sensible Receptor muß in ähnlicher Weise energieärmer geworden sein, wie die „receptive Substanz" der Muskelzelle. Entsprechend den wechselseitigen Beziehungen zwischen Oxydationsstoffwechsel und Struktur muß noch offenbleiben, welcher der beiden Teile zuerst oder ob sie beide gleichzeitig betroffen werden. Bis zur völligen Ausbildung der Anaesthesie bzw. Kontraktur sind je nach Konzentration und Einwirkungsdauer alle Übergänge möglich, meßbar zu erfassen z. B. an dem Ausmaß der Muskelverkürzung und der verbleibenden Erregbarkeit gegenüber dem bisherigen Reiz.

Die Tatsache, daß die „Anaesthesia dolorosa“ in reversibler und irreversibler Form auftreten kann, zeigt, daß Stoffe aus der Gruppe der Anaesthetica dolorosa die Zellstrukturen in verschiedener Weise beeinflussen können. Dies läßt sich auch aus der ganz verschiedenen Konsistenz und der erreichten Verkürzung der „Kontraktur“-Muskeln schließen. Wir brauchen nur an den verhärteten und mikroskopisch destruktiv veränderten Muskel bei der Coffeinstarre zu denken (Schüller).

Membran und Zellstruktur bedeuten ein komplexes System, in dem nach Frey-Wyssling Lipoidmoleküle (Lecithin, Cholesterin), Eiweißketten, Fette, Kohlenhydrate mosaikartig ineinandergelagert sind, hydrophile Gruppen gegen hydrophile Gruppen und lipophile Gruppen gegen andere lipophile. Hier sind verschiedenartige Möglichkeiten zur Membranänderung und damit zur Depolarisation gegeben. Eine direkt schädigende Einwirkung auf die Eiweißkörper muß die Konsistenz und Muskellänge besonders beeinflussen. Ein gemeinsames Endstadium, das nichts über die spezifische Änderung in der Membranstruktur aussagt, ist die mit der Membranauflockerung eintretende, sich steigernde und schließlich völlige ausgebildete Depolarisation.

Der völlige Funktionsausfall ist beim sensiblen Receptor die *Depolarisationsanaesthesie*, beim Muskel die völlig ausgebildete *Depolarisationskontraktur*. Davor gibt es eine Skala von Übergangsstufen. Da die Wirkung der Kathode die Anaesthesie am Nerven und die Kontraktur am Muskel nachahmt, ohne daß damit auf einen gleichen Wirkungsmechanismus geschlossen werden kann, möge für die Anaesthetica dolorosa hier die Bezeichnung *Anaesthetica katelektrotonica* gewählt werden. *Do R 9/R 3, B 76 und B 77, aber auch Veratrin sind Anaesthetica katelektrotonica*, wie so viele andere, teilweise oben angeführte Anaesthetica dolorosa. Die Analyse wird für jeden dieser vielen Stoffe den oder die Angriffspunkte genauer erfassen müssen.

Uns erschien vor allem die Tatsache sehr bemerkenswert, daß *in der großen Gruppe der Anaesthetica dolorosa einzelne Stoffe sich fanden, die auch an inneren sensiblen Receptoren eine Dämpfung, ja Ausschaltung der Impulsaktivität hervorriefen.* Wenn wir die früher von uns als endoanaesthetisch gefundenen Lokalanaesthetica vom anelektrotonischen Typ (Procain u. a. ) als „Endoanaesthetica anelektrotonica“ bezeichnen können, so haben wir im Do R 9/R 3, B 76 und B 77, ja sogar Veratrin selbst eine Gruppe von Stoffen vor uns, die nicht nur „Lokalanaesthetica katelektrotonica“, sondern auch *Endoanaesthetica katelektrotonica* darstellen. Es handelt sich hier um eine *weitere Möglichkeit der Endoanaesthesie.*

Die Kennzeichnung als „Endoanaesthetica katelektrotonica“ ist auch deshalb erlaubt, weil Procain in der Lage war, bei den geprüften Stoffen die Erregungskontraktur am Muskel zu verhindern. Es handelt sich um einen *Antagonismus zwischen dem „Anelektrotonicum“ Procain und unseren „Katelektrotonica“ Do R 9/R 3, B 76* und, wie aus der Literatur bekannt, auch gegenüber Veratrin.

Wir möchten an dieser Stelle noch einige Ergebnisse erwähnen, die wir bei *Hämolyseversuchen in vitro* mit menschlichen Erythrocyten gewonnen haben: B 76 wirkte minimal hämolysierend ab 1—2 $\times$ $10^{-5}$, maximal bei 2—3 $\times$ $10^{-5}$. Do R 9/R 3 zeigte einen minimalen hämolysierenden Einfluß bei 2 $\times$ $10^{-5}$, einen maximalen bei 5 $\times$ $10^{-5}$. Die Grenzkonzentrationen stimmen fast völlig mit denen von Soehring u. Nasemann gefundenen überein. Gegenüber beiden Stoffen zeigte *Procain* einen *partiellen antihämolytischen* Einfluß, am deutlichsten ausgeprägt bei Zusatz einer 1%igen Procainlösung zu den verschiedenen Konzentrationen der Netzmittel. Es wurde streng darauf geachtet, daß alle benutzten Kombinationen von B 76 und Do R 9/R 3 einerseits und Procain andererseits isoton eingestellt waren, was sich durch entsprechend abgestimmten NaCl-Zusatz leicht erreichen ließ. Der Procainzusatz verschob bei Do R 9/R 3 die minimale Hämolysegrenze um die Konzentrationsstufe von 1 $\times$ $10^{-5}$, bei B 76 beide Grenzen um 3 $\times$ $10^{-5}$.

Solche Versuche können sicherlich nicht in volle Parallele gesetzt werden zu denjenigen an Lungendehnungsreceptoren oder am isolierten Froschmuskel, bei denen wir die antagonistische Wirkung gegenüber Funktionen dieser Gewebe nachwiesen. Die Hämolyse ist der Ausdruck stärkerer Membranänderungen, und es ist von vornherein zu erwarten, daß analog den Verhältnissen bei der Schädigungskontraktur die Hämolyse nicht völlig unterdrückt werden kann. Immerhin können die Verschiebungen der hämolytischen Grenzkonzentrationen so gedeutet werden, daß das anelektrotonische Procain von vornherein den Katelektrotonica B 76 und Do R 9/R 3 den Eintritt in die Membran erschwert.

Der Dodecyl-polyäthylenoxydäther *Do R 9/R 3* hebt sich durch die *besonders günstige endoanaesthetische Wirkung* hervor. Im Gegensatz zu B 76 und B 77 *fehlt ihm in intravenös zulässigen und wirksamen Dosen ein sensibilisierender Einfluß auf die Lungendehnungsreceptoren.* Auch für die Unterhaut und die Schleimhaut gibt es einen anaesthesierenden Konzentrationsbereich (unterhalb 0,5%), in dem schmerzreizende Wirkungen auf die äußeren Receptoren nicht mehr vorkommen, und in diesem Konzentrationsbereich entwickelt sich die Erregungskontraktur am Muskel nur sehr langsam und gering. Entscheidend für das Auftreten erhöhter Impulsaktivität von Receptoren muß die depolarisierende membranöffnende Änderung pro Zeiteinheit sein. Sie ist bei Do R 9/R 3 sicherlich gering, geringer als bei B 76 und B 77.

Wir wollen am Schluß noch auf ähnliche Verhältnisse in der Gruppe der peripher muskellähmenden Stoffe hinweisen. Auch hier kann eine deutliche Zweiteilung herausgelesen werden (siehe bei v. Brücke). Entweder wird der Ionenvorgang der Depolarisation verhindert, etwa durch Stoffe vom Typ des d-Tubocurarins (Anelektrotonica), oder es kommt an der Endplatte zu einer Depolarisation, die die Wiederaufrichtung des Membranpotentials verhindert, z. B. durch Körper von der Art des Dekamethoniums (Katelektrotonica). Der Lähmung geht im letzten Falle eine kurzdauernde Muskelerregung voraus. Für die Wirkung von Do R 9/R 3 am indirekt elektrisch gereizten Rattenzwerchfell in vitro (Soehring, Dass u. Stave) möchten wir eine solche „katelektrotonische", muskellähmende Wirkung annehmen.

Wie schwer es aber ist, die feste Zweiteilung solcher Stoffgruppen beizubehalten, sehen wir an dem Verhalten des d-Tubocurarins am Säugetiermuskel, allerdings am denervierten. Hier führt der Stoff zu fibrillären Zuckungen, bevor eine Unerregbar-

keit gegenüber Acetylcholin eintritt, in hohen Dosen sogar zu einer Muskelkontraktur (McIntyre, King u. Dunn, sowie Jarcho, Berman, Eyzaguirre u. Lilienthal).

Kehren wir zur Gruppe der Lokalanaesthetica zurück, dann sehen wir bei Cocain, Tetracain, Pantocain, Procain und vor allem bei so vielen experimentell geprüften, aber nicht in den Handel gegebenen Körpern Reizwirkungen an der Schleimhaut und in der Haut. Nicht nur die allgemeine Toxicität, auch die Stärke der lokalen Reizwirkung steigt geradezu mit der lokalanaesthetischen Wirksamkeit (Luduena u. Hoppe). Wenn also auch die beiden Grundtypen, der anelektrotonische und der katelektrotonische, grundsätzlich und experimentell herauszustellen sind, so bleibt doch zum Schluß die Frage, ob eine scharfe und übergangslose Zweiteilung der Pharmaka in Anelektrotonica und Katelektrotonica möglich ist, ob viele Vertreter der einen oder anderen Seite nicht beides sind, wenn auch mit überwiegend ein- oder anderseitigem Charakter.

## Zusammenfassung.

Die bei der Anaesthesia dolorosa in Schleimhaut und Haut auftretenden beiden Wirkungsphasen, die primäre Erregbarkeitssteigerung (Sensibilisierung) und die Anaesthesie ließen sich grundsätzlich auch intravenös an der Impulsaussendung der Lungendehnungsreceptoren von urethanisierten Meerschweinchen zeigen. Geprüft wurden: Cyclooctylphenyl-carbinol-$\beta$-diäthyl-amino-äthyläther-HCl (= B 76), Cyclooctylphenyl-carbinol-$\beta$-äthyl-pyrrolidin-HCl (= B 77), vergleichsweise auch Veratrin und Germitrin. Nach einer primären Phase kontinuierlicher Impulstätigkeit (Dauerentladung) kam es zu einer zweiten Phase partieller Endoanaesthesie.

Neben die anelektrotonische Form der Endoanaesthesie (durch Lokalanaesthetica vom Procaintypus) wird eine katelektrotonische Form der Endoanaesthesie gestellt, die durch die obengenannten Stoffe, aber auch den Dodecylpolyäthylenoxydäther Do R 9/R 3 zustande kommt. Erwartungsgemäß besaß das Procain einen antagonistischen Einfluß auf die durch B 76 und Do R 9/R 3 verursachte Erregungskontraktur am Froschgastrocnemius, in geringerem Maße auch gegenüber der Hämolyse in vitro.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung dieser Arbeit.

## Literatur.

Boehm, R.: Heffters Hdb. exper. Pharmakol. Berlin: Springer 1920. — Brücke, F. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 70 (1953). 19. Tag. d. Dtsch. Pharmakol. Ges. in Göttingen. — Fleckenstein, A.: Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzbekämpfung. Frankfurt a. M.: Steinkopff 1950. — Gross, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **62**, 380 (1910). — Hardt, A., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 39 (1949). — Heinemann, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 316 (1938). — Jarcho, L. W., B. Bergmann, C. Eyzaguirre and J. L. Lilienthal: Ann. New York Sci. **54**, 337 (1951). — Jarisch, A., u. Y. Zottermann: Acta physiol. scand. (Stockh.) **16**, 31 (1948). —

Kreppel, E., et H. F. Zipf: Arch. internat. Pharmacodynamie **101**, 279 (1955). — Langley, G.: J. of Physiol. **36**, 347 (1907); **39**, 235 (1910). — Luduena, F. P., and J. O. Hoppe: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **104**, 40 (1952). — McIntyre, A. R., R. E. King and A. L. Dunn: J. of Neurophysiol. **8**, 297 (1945). — Neuschlosz, S. M.: Pflügers Arch. **207**, 52 (1925). — Rhode, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **91**, 173 (1921). — Rothlin, E., u. A. Cerletti: Schweiz. med. Wschr. **1954**, 137. — Soehring, Kl., H. Dass et H. Stave: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 365 (1952). — Soehring, Kl., et Th. Nasemann: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 96 (1952). — Schüller, J., u. F. Athmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **91**, 125 (1921). — Schüller, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **105**, 299 (1925). — Stückradt, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 362 (1939). — Weigmann, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 116 (1951). — Zipf, H. F., u. E. Kreppel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 340 (1955).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Berlin-Dahlem, Int. für Veterinär-Pharmakologie u. exper. Pathologie d. Freien Univ., Bitterstr. **14**—16.
Dr. E. Kreppel u. Dr. E. Wetzels, Bonn, Pharmakologisches Institut, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 363—376 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

# Die Trachealverschlußreaktion nach Head, eine Hilfsmethode zum Nachweis endoanaesthetischer Wirkungen.

Von
H. F. Zipf und H. Oehler.

Mit 9 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 24. März 1955.)*

Ein Reflexerfolg von den Lungendehnungsreceptoren her, der experimentell gut faßbar ist, wurde in Form der *Trachealverschlußreaktion* (TVR) von Head 1889 beschrieben: Schließung der Trachea bei intakten Vagi verändert die zeitlichen Verhältnisse der Atemphasen, am stärksten, wenn der Trachealverschluß (TV) am Ende der Inspiration oder der Exspiration ausgeführt wird. Verschluß in inspiratorischer Endlage führt zu einer Verlängerung der nachfolgenden Exspirationsphase, wirkt also exspiratorisch aktivierend. Im folgenden wird diese Reaktionsform deswegen die *exspiratorisch aktivierende TVR genannt.* Umgekehrt kommt es beim Verschluß in exspiratorischer Atemruhelage zu einer Verlängerung der folgenden Inspirationsphasen: *inspiratorisch aktivierende TVR.* Die Verlängerung ist an der ersten Atemphase nach dem Verschluß am stärksten ausgeprägt. Sie nimmt durch Adaptation an die afferenten Impulse bei den nächsten Atembemühungen ab.

Für die Deutung dieser Abnahme der TVR kann man einerseits eine Adaptation der Zentren an die afferenten Impulse annehmen. Andererseits ist es möglich, daß die bei dem TV kumulierende $CO_2$ den Einfluß der Vagusafferenzen unterdrückt. So fand Josenhans, daß eine $CO_2$-Atmung den exspiratorischen Effekt der 300 Hz-Reizung des zentralen Vagusstumpfes verhindert.

Für die Auswertung ist somit die erste Phase nach dem TV besonders gut geeignet. Die Phasenveränderungen können absolut, nach Meier aber auch durch das Verhältnis von Inspirations- und Exspirationsdauer (relative Phasenlänge) erfaßt werden.

Bucher u. Schneider machten die interessante Beobachtung, daß das Lokalanaestheticum Diäthylaminoäthyl-tetrahydrofluoranthen (D.T.F.) bei intravenöser Verabreichung die exspiratorisch aktivierende TVR stark abschwächte, die inspiratorisch aktivierende hingegen verlängerte. Im gleichen Sinne wirkte eine i.v. Dauerinfusion von Novocain (= Procain) und Percain. Wie Bucher (1947) dann durch elektrophysiologische Ableitung von isolierten Einzelfasern des Lungenvagus (Kaninchen) bewies, handelte es sich bei allen drei Lokalanaesthetica um eine

*Dehnungsreceptorenanaesthesie in der Lunge.* Die bei diesen Versuchen verabreichten Einzeldosen lagen sehr hoch, für die D.T.F. bei 10 mg/kg, für Procain bei 20 mg/kg.

Wir haben die Erfahrungen von Bucher mit der TVR aufgegriffen und uns die Frage gestellt, ob die TVR qualitativ und quantitativ geeignet ist, neben die elektrophysiologische Methode zu treten. Außerdem haben wir die TVR durch Pharmaka variiert, um zusätzliche Kriterien zur Beurteilung zu gewinnen. Es ist von vornherein der Einwand zu machen, daß bei dem in der TVR sich zeigenden *Lungenvolumenreflex* auch cerebrale und spinale Synapsen eingeschaltet sind. Hinzu kommen schließlich noch Afferenzen von pneumotaxischen Zentren im Mittelhirn und der Pons. Die Verhältnisse liegen ähnlich kompliziert wie bei den Kreislaufreflexen. Bei der Abschwächung der TVR durch Lokalanaesthetica läßt sich also (analog den Verhältnissen bei dem Antagonismus dieser Stoffe gegenüber dem Bezold-Jarisch-Reflex) ein zentraler Angriffspunkt nicht von vornherein ausschließen. Der direkte und sichere Beweis der Dehnungsreceptorenanaesthesie (Endoanaesthesie) ist darum nur am System Organreceptor—afferente Faser durch elektrophysiologische Ableitung der afferenten Aktionsimpulse zu erbringen (Zipf, hier auch weitere Literaturangaben).

Die folgenden Untersuchungen sollen deshalb mehr den *Wert der normalen und der variierten TVR als Hilfsreaktion zum Nachweis endoanaesthetischer Wirkungen an Lungendehnungsreceptoren* hervorheben. Wir haben hierzu die exspiratorisch aktivierende TVR herangezogen und zwar

1. bei normalen, nichtsensibilisierten Lungendehnungsreceptoren,
2. nach Sensibilisierung der Lungendehnungsreceptoren durch Veratrin,
3. nach pontiner Enthemmung der Lungenvagusafferenzen durch Morphin,
4. nach kombinierter Anwendung von Veratrin und Morphin.

Aus der Gruppe der Lokalanaesthetica prüften wir *Procain*, *Tetracain*, $\omega$-Diäthylamino-essigsäure-2,6-dimethylanilid-hydrochlorid = *Lidocain* und $\omega$-n-Butylamino-essigsäure-2-methyl-6-chloranilid-hydrochlorid = *Hostacain* „Hoechst". Als Versuchstiere dienten *Kaninchen*.

## Methodik.

Die Versuchsanordnung hat vor allem Bucher (1943) entwickelt. Einige Modifikationen hat Josenhans angegeben. Das *Atemzugvolumen* und die *Atemfrequenz* wurden von einem Körperplethysmographen aus auf einem Rußkymographion aufgezeichnet. Papiergeschwindigkeit: 3,5 mm/sec. Zur Registrierung diente ein *Blasebalgschreiber*, durch den für 3,8 $cm^3$ Atemvolumen ein Ausschlag von 1 mm auf der Trommel geschrieben wurde. Der Verbindungsschlauch zur Frontplatte des Plethysmographen wurde mit 2,5 cm Durchmesser besonders dick gewählt. In den Kurven befindet sich die Inspirationslage unten, die exspiratorische Atemruhelage oben. In den mit Glaswänden versehenen *Körperplethysmograph* (100/25/25 cm)

konnte das *urethanisierte Kaninchen* im Ganzen eingebracht werden. Für den luftdichten Abschluß der beiden Verschlußdeckel sorgten Gummidichtungen und Scharnierverschlüsse. Von der *Trachealkanüle* lief ein möglichst kurzer Verbindungsschlauch zu einem in der metallenen Frontplatte außen angebauten Gashahn, durch den das Tier frei nach außen atmete. Toter Raum 9 cm³. Der Trachealverschluß (TV) erfolgte durch Zudrehen des Gashahnes. Über einen Seitenweg (zwischen Hahn und Frontplatte) wurde während des TV der *Trachealseitendruck* und damit die Atembemühung auf der Trommel mitgeschrieben (Druckzunahme nach oben registriert). Die Venenkanüle in der Vena jugularis war über einen dünnen Kunststoffschlauch durch die Frontplatte hindurch nach außen mit der Injektionsspritze verbunden.

## Versuchsergebnisse.

### *I. Der Einfluß von Lokalanaesthetica auf die normale exspiratorisch aktivierende Trachealverschlußreaktion.*

Der Ausfall der exspiratorisch aktivierenden TVR ist von dem Grade der Lungenfüllung abhängig. Bucher (1952) stellte in Form einer Mittelwertskurve beim Kaninchen in Äthernarkose die prozentuale Verlängerung der Exspirationsphase in Abhängigkeit von dem Atemzugvolumen dar. Für die Aufstellung einer solchen Kurve am Einzeltier müßte streng genommen die Atemfrequenz, aber auch die Geschwindigkeit der Lungenblähung konstant bleiben, Bedingungen, die sich aber beim spontan atmenden Tier nicht einstellen lassen.

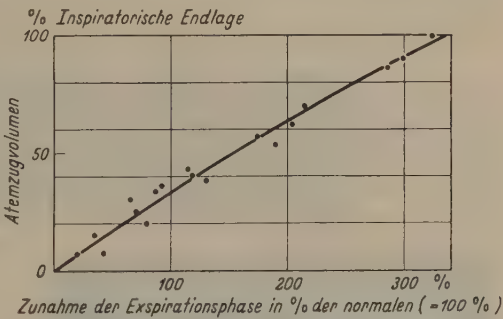



Abb. 1. Abhängigkeit der exspiratorisch aktivierenden Trachealverschlußreaktion (TVR) nach Head von dem Atemzugvolumen. 18 Mittelwerte aus Versuchen an Kaninchen in Urethannarkose.

Unsere Abb. 1 gibt die von uns gewonnene *Mittelwertskurve* wieder. Sie zeigt für das *Kaninchen* in Urethannarkose, daß mit zunehmender Lungendehnung die exspiratorisch aktivierende Trachealverschlußreaktion immer größer wird. Beim Verschluß in exspiratorischer Endlage (Atemzugvolumen = 100%) wird die Exspirationsdauer um 330% verlängert. Die Werte und die Kurvenform unterscheiden sich von denen Buchers (1952, S. 20). Für solche Abweichungen ist die gewählte Narkoseart, die den Lungenvolumenreflex zentral beeinflußt, verantwortlich zu machen. Auch an eine Erregung oder Hemmung der Lungenreceptoren durch Narkotica bzw. Hypnotica ist zu denken[1]. So betrug bei Kaninchen unter Dial-Narkose die exspiratorische TVR 450% der normalen Exspirationsdauer (Bucher 1942).

[1] Lit. siehe Killian-Weese, S. 119.

Bei der Prüfung von *Lokalanaesthetica* gegenüber dem normalen Lungenvolumenreflex ist zu beachten, daß durch eine zusätzliche zentrale Einwirkung das Atemzugvolumen herabgesetzt, und die Lungendehnungsreceptoren dadurch mechanisch weniger erregt werden können. Nur in seltenen Versuchsfällen behält das Atemzugvolumen nach der Verabreichung des Lokalanaestheticums die gleiche Höhe wie bei der Ausgangsatmung. Von dem registrierten Werte muß man dann denjenigen Anteil der Phasendaueränderung abziehen, der auf diese Änderung des Atemzugvolumens entfällt. Die Korrektur erfolgt am besten an Hand einer „*Einzeltierkurve*", die man gewinnt, wenn man die TVR auch für die zwischen den Atemlagen liegenden Lungenfüllungen anstellt. In der Abb. 2 haben wir eine solche Kurve eingezeichnet. Man erhält durch Einbeziehung der aus dieser Kurve sich ergebenden Korrekturen die „wirklichen exspiratorischen Phasenverlängerungen". Und nun ein Beispiel: Im Versuche der Abb. 3 wurden 5 mg/kg *Procain* intravenös gegeben. Die beim inspiratorischen TV eintretende Verlängerung der Exspirationsdauer (*a*) ist nach Procain (*b*) deutlich verkürzt. Die Wirkung hält eine kurze Zeit an und erreicht schnell die Ausgangslage wieder (*c*, *d*). An Hand der Zeit/Wirkungskurve eines weiteren Versuches, in der die ausgemessenen Exspirationsphasen prozentual zur Ausgangslage (= 0%) eingetragen sind, lassen sich die Wirkungen gut übersehen (Abb. 7a). Es ergibt sich eine Wirkungsdauer von etwa 2—3 min, einschließlich Abklingzeit. Die gleiche Zeit kann an der hinzugezeichneten Kurve der korrigierten Werte abgelesen werden. Im ganzen stellten wir im Dosenbereich von 2—10 mg/kg Procain in 20 Fällen an 22 Versuchstieren die typische

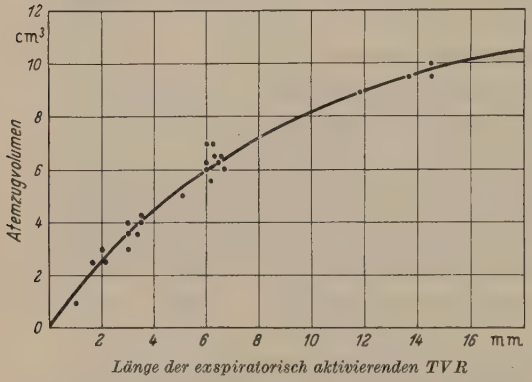



Abb. 2. Einzeltierkurve der Abhängigkeit der exspiratorisch aktivierenden Trachealverschlußreaktion (TVR) nach Head vom Atemzugvolumen. Die TVR wurde jeweils in mm Kurvenstrecke bei einer Papiergeschwindigkeit von 3,5 mm/sec ausgemessen. Kaninchen, ♀, 2,5 kg. Narkose 1,2 g/kg Urethan i.v.

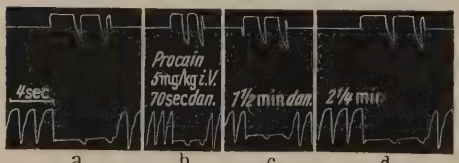



Abb. 3 *a—d*. Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden Trachealverschlußreaktion (TVR) nach Head durch 5 mg/kg Procain-Hydrochlorid i.v. bei *normaler Atmung*. Kaninchen, ♂, 3,5 kg. Narkose 1,2 g/kg Urethan. Trachealseitendruck: obere Kurve; Druckzunahme nach oben. Atemzugvolumen: untere Kurve; Inspiration nach unten.

Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden TVR fest. Als gut wirksame i.v. *Grenzdosis* erwiesen sich 2 mg/kg. Sie entspricht genau dem von Zipf u. Miestereck an der Katze, sowie von Kreppel u. Zipf am Meerschweinchen mit der elektrophysiologischen Methode gewonnenen Werte. *Tetracain* wurde zwischen 0,1—1 mg/kg 6mal an 5 Tieren, *Lidocain* zwischen 2—10 mg/kg 5mal an 4 Tieren und *Hostacain* zwischen 0,1—1 mg/kg i.v. 11mal an 5 Tieren wirksam gefunden. Der Reihe nach ergaben sich folgende *Grenzdosen*: 0,15 mg, 3 mg und 0,2 mg/kg intravenös. Die *Wirkungsdauer* umfaßte, wie bei Procain, nur wenige Minuten, bei Tetracain etwa $1^1/_2$—2, bei Lidocain 1—2 und bei Hostacain 1—2 min. Auch hier lagen die Wirkungszeiten nahe bei den elektrophysiologisch gewonnenen. Zeit/Wirkungskurven für Tetracain und Lidocain siehe in den Abb. 8a und 9a.

*II. Die Trachealverschlußreaktion nach Receptorensensibilisierung durch Veratrin und der antagonistische Einfluß der Lokalanaesthetica.*

Meier, Bein u. Helmich, sowie Zipf u. Miestereck wiesen nach, daß die Lungendehnungsreceptoren durch Veratrin stark sensibilisiert werden, so daß sie auf die normalen mechanischen Reize kontinuierlich Impulse aussenden.

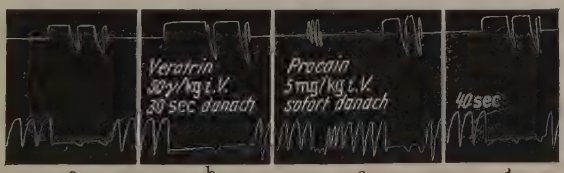



Abb. 4 *a—d*. Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden TVR durch 5 mg/kg Procain-Hydrochlorid i.v. nach Sensibilisierung durch 50 γ/kg Veratrinsulfat. Sonstiges siehe Abb. 3; gleiches Tier.

Diese Dauerentladungen sind schon länger bekannt für den durch Veratrin ausgelösten Bezold-Jarisch-Reflex. Mit dessen Bradykardie und Hypotonie läuft immer auch eine exspiratorisch betonte Atemhemmung parallel. Man wird für diese in erster Linie die chemisch sensibilisierten Lungendehnungsreceptoren verantwortlich machen, wenngleich noch an die Reflexgenese von anderen Receptoren her, etwa des Gefäßgebietes der Pulmonalarterien zu denken ist.

Die Verlängerung der exspiratorisch aktivierenden TVR nach *50 bis 100 γ/kg Veratrinsulfat* (enthält Veratridin und Cevadin), wie aus der Abb. 4a und b ersichtlich ist, läßt sich in der Weise deuten, daß die sensibilisierten Dehnungsreceptoren durch die normalen Dehnungsreize stärker erregt werden und den Zentren eine scheinbar größere Lungendehnung melden, als wirklich vorhanden ist.

Gibt man auf dem Höhepunkt der Veratrinwirkung 5 mg/kg Procain i.v., dann verschwindet augenblicklich die exspiratorische Phasenverlängerung (Abb. 4c). Darüber hinaus wird die Exspirationsdauer unter die Ausgangslage abgeschwächt, so wie es oben für die Procainwirkung gegenüber normalen (d. h. nichtsensibilisierten) Receptoren angegeben

wurde. (Siehe auch für einen weiteren Versuch die Zeit/Wirkungskurve in der Abb. 7b.) Wegen der flüchtigen Wirkung des Procains (und anderer Lokalanaesthetica) war es ohne weiteres möglich, Lokalanaesthetica nacheinander gegenüber normalen und veratrinbeeinflußten Lungendehnungsreceptoren am gleichen Tier zu prüfen.

In Versuchen an 23 Tieren fanden wir im Dosenbereich von 2 bis 10 mg/kg 21 mal die Antiveratrinwirkung von Procain. Als wirksame i.v. Grenzdosis erwiesen sich wiederum 2 mg/kg. *Tetracain* wurde zwischen 0,15—0,7 mg/kg 2mal an 2, *Lidocain* zwischen 2—10 mg/kg 4mal an 2 und *Hostacain* zwischen 0,15—0,7 mg/kg 3mal an 2 Kaninchen als wirksam gefunden. Der Reihe nach lagen die i.v. *Grenzdosen* bei 0,15 mg, 3 mg und 0,2 mg/kg, also in gleicher Höhe wie gegenüber nichtsensibilisierten Receptoren. Zeit/Wirkungskurven für Tetracain und Lidocain sind in den Abb. 8b und 9b wiedergegeben.

*III. Die Trachealverschlußreaktion nach „pontiner Enthemmung" durch Morphin und ihre Beeinflussung durch Lokalanaesthetica.*

Die von Cushny 1913 geäußerte Ansicht, daß nach Morphin die atmungshemmenden Vagusafferenzen zentral verstärkt zur Wirkung kämen, hat Bucher

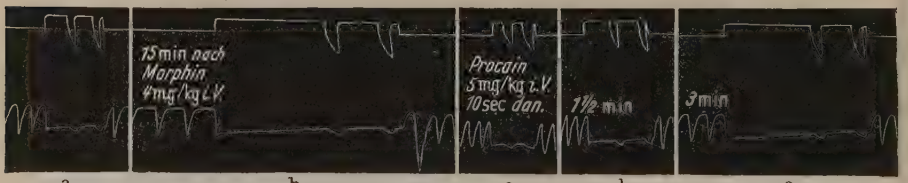



Abb. 5 *a—e*. Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden TVR durch 5 mg/kg Procain-Hydrochlorid i.v. nach pontiner Enthemmung der Lungenvagusafferenzen durch Morphin-Hydrochlorid. Sonstiges siehe Abb. 3; gleiches Tier.

1944 eingehender analysiert. Er wies nach, daß die Verschiebung der Spontanatmung und der Atemreflexe nach der exspiratorischen Seite nach Morphin genau so ausfiel, wie wenn er die Pons in ihrer caudalen Hälfte durchschnitten hätte. Für den zentralen Angriff des Morphins sprach, daß auch die lokale Aufbringung von Morphin auf die caudale Ponshälfte zu dieser Verstärkung der Vagusafferenzen führte. (Fischlewitz, sowie Fischlewitz u. Bucher.) Zur Diskussion steht, ob durch Morphin das zentrale Hemmungssystem in der Pons (pneumotaxisches Zentrum nach Lumsden) gehemmt wird, das normalerweise den afferenten Lungenvagus dämpft, oder ob die Afferenzen in der Pons aktiviert werden. Ersteres ist wahrscheinlicher.

An der exspiratorisch aktivierenden TVR läßt sich die durch Morphin verstärkte Wirkung der Vagusafferenzen besonders gut zeigen. Schon mit Dosen ab 2 mg/kg Morphinhydrochlorid fällt die erste Exspirationsphase nach dem inspiratorischen TV erheblich länger aus als bei der Normalatmung. Bucher (1944) sah Verlängerungen bis zu 450%. In den Abb. 5b und 6a geben wir einige Beispiele wieder.

Verabreicht man in dieser Phase der Morphinwirkung Lokalanaesthetica intravenös, dann reduziert sich die TVR teilweise oder völlig zur Norm. Im Beispiel der Abb. 5c wurden 5 mg/kg *Procain* injiziert. Die völlige Aufhebung (sogar unter die Ausgangslage) hält, wie vorauszusehen, nur kurze Zeit an. Aus der Zeit/Wirkungskurve der Abb. 7c (anderer Versuch) kann man eine Wirkungsdauer von etwa 5 min ablesen.

Mit *Procain* zwischen 2—10 mg/kg wurde 17mal bei 16, mit *Tetracain* zwischen 0,15—0,7 mg/kg 2mal bei 2, mit *Lidocain* zwischen 2—10 mg/kg

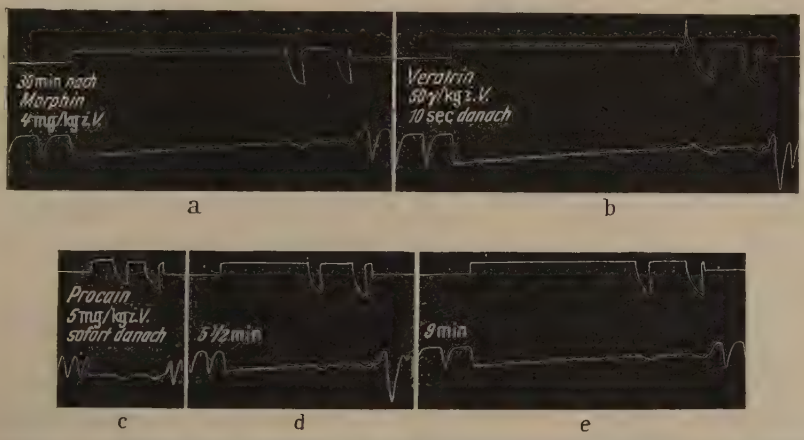



Abb. 6 *a—e*. Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden TVR durch 5 mg/kg Procain-Hydrochlorid v. nach pontiner Enthemmung durch Morphin-Hydrochlorid und zusätzlicher Receptorensensibilisierung durch Veratrinsulfat. Sonstiges siehe Abb. 3; gleiches Tier.

3mal bei 3 und mit *Hostacain* zwischen 0,15—0,7 mg/kg 2mal bei 2 Kaninchen die Aufhebung der Morphin-TVR nachgewiesen. Die wirksamen *Grenzdosen* lagen auch hier der Reihe nach bei 2, 0,15, 3 und 0,2 mg/kg intravenös. Für Tetracain und Lidocain finden sich Zeit/Wirkungskurven in den Abb. 8c und 9c.

Es läßt sich diese Reduktion der TVR wie diejenige beim Normaltier deuten: Die „pontine Enthemmung" muß um so geringer zur peripheren Auswirkung kommen, je geringer die Zahl und Stärke der afferenten Vagusimpulse wird.

### *IV. Der kombinierte Einfluß von Receptorensensibilisierung und „pontiner Hemmung" auf die Trachealverschlußreaktion und die Gegenwirkung der Lokalanaesthetica.*

Es lag nahe, auch die Kombination Veratrin + Morphin anzuwenden, um auch hier die antagonistische Wirkung der Lokalanaesthetica zu zeigen. In Abb. 6b ist das Ergebnis des Zusammenwirkens von peripherer Receptorensensibilisierung und „pontiner Enthemmung" dargestellt. Die

exspiratorisch aktivierende TVR wird durch 100 $\gamma$/kg Veratrinsulfat um einen weiteren Betrag verlängert.

Lokalanaesthetica beseitigen sowohl die Veratrinwirkung als auch die Morphinwirkung. In Abb. 6c kommt eine solche Beeinflussung für 5 mg/kg *Procain* zum Ausdruck. Aus der Zeit/Wirkungskurve des zweiten Versuchsbeispieles in der Abb. 7d ergibt sich eine Wirkungsdauer von etwa 5 min. Für *Procain* zwischen 2—10 mg/kg stellte sich die Wirkung 17mal an 16, für *Tetracain* zwischen 0,15—0,7 mg/kg 2mal an 2, für *Lidocain* zwischen 2—10 mg/kg 3mal an 3 und für *Hostacain* zwischen 0,2—0,7 mg/kg 2mal an 2 Tieren ein. Die Grenzdosen der Reihe nach wiederum: 2, 0,15, 3, und 0,2 mg/kg intravenös. Zeit/Wirkungskurven für Tetracain und Lidocain geben die Abb. 8d und 9d wieder.

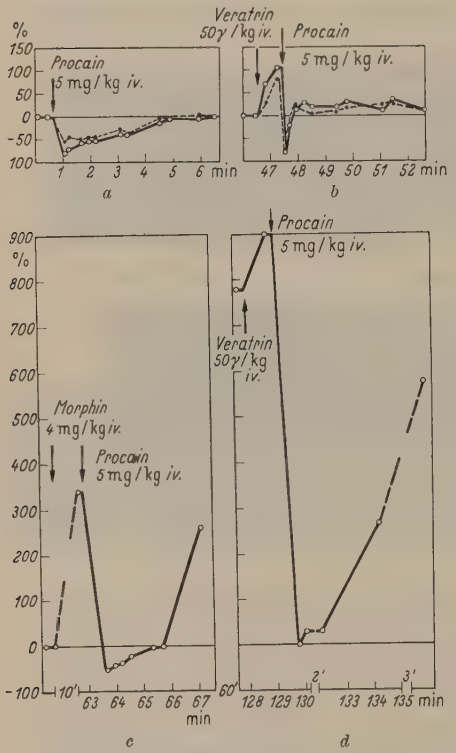



Abb. 7 *a—d*. Verkürzung der exspiratorischen Trachealverschlußreaktion nach Head durch Procain-Hydrochlorid. Kaninchen, ♀, 2 kg Urethannarkose.

### *V. Zur Frage des zentralen Anteils an der Wirkung der Lokalanaesthetica gegenüber der exspiratorischen TVR.*

Um den zentralen Anteil der Wirkung der Lokalanaesthetica abzugrenzen, schalteten wir einerseits durch beiderseitige Vagotomie (am Halse) die Lungenrezeptoren aus, andererseits ersetzten wir die wegfallende afferente Impulsaussendung der Dehnungsrezeptoren durch eine *frequente elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes* mit *Rechteckimpulsen* von 1 msec Dauer. Diese „Phantomafferenzen" ahmten sozusagen eine Lungendehnung nach, wenngleich sie natürlich nicht voll übereinstimmen können mit der durch TV in Inspirationsstellung entstehenden afferenten Impulstätigkeit der Lungendehnungsreceptoren.

Je nach Wahl der Reizfrequenz kommt es bei verschiedenen Tieren bekanntlich zu verschiedenen Atmungswirkungen (Rice, sowie Wyss): Hohe Frequenzen von 300 Hz wirken exspiratorisch aktivierend (relative Verlängerung der exspiratorischen Phase, Atemverlangsamung, Verminderung des Zwerchfelltonus), entsprechend dem Blähungseffekt, niedere (z. B. 20 Hz) inspiratorisch (relative

Verlängerung der inspiratorischen Phase, Tachypnoe, Zunahme des Zwerchfelltonus), entsprechend dem Kollapseffekt von Hering u. Breuer. Wir haben an 5 Tieren von insgesamt 6 Kaninchen mit 300 Hz den Effekt hoher Frequenzen eingestellt (5mal exspiratorische Verschiebung, dabei gleichzeitig exspiratorischen Atemstillstand mit nachfolgender Bradypnoe.)

Intravenöse Gaben von 5 mg/kg *Procain*, die auch die exspiratorische TVR zuverlässig herabsetzten, verkürzten in allen 5 Fällen den elektrisch herbeigeführten Stillstand, 2mal gleichzeitig die Bradypnoe, verringerten aber nur 1mal gleichzeitig auch die exspiratorische Verschiebung der

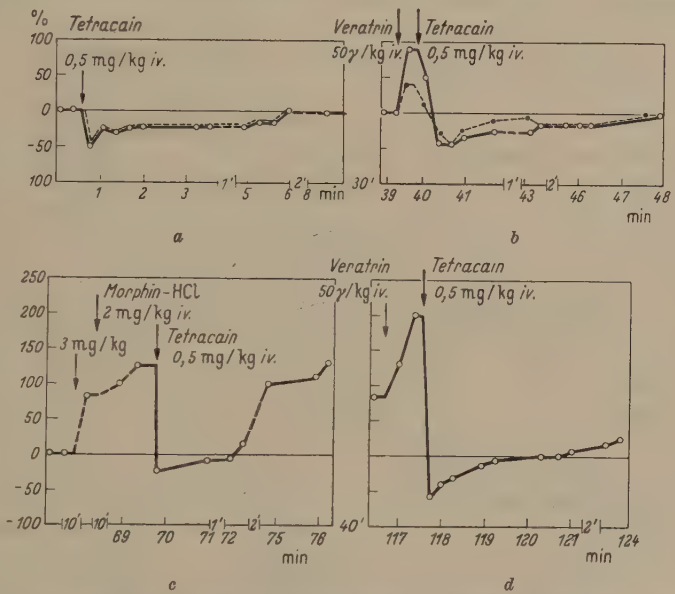



Abb. 8 *a—d*. Verkürzung der exspiratorischen Trachealverschlußreaktion nach Head durch Tetracain-Hydrochlorid, Kaninchen, ♀, 3 kg, Urethannarkose.

Atemlage. Letztere wurde 3mal nicht beeinflußt, 1mal sogar verstärkt. Die Bradypnoe blieb 2mal unverändert. Aus diesen Ergebnissen leiteten wir ab, daß *Procain*, wenn auch nicht in jedem Falle, *eine zentrale Hemmwirkung auf frequente vagale Afferenzen ausübt*, wodurch eine exspiratorische Atemaktivierung wieder gedämpft werden kann. Diese Wirkung läuft in gleicher Richtung, wie die Dehnungsreceptorenanaesthesie selbst.

Hingegen zeigten die Wirkungen i.v. *Veratringaben* keineswegs eine so weitgehende Übereinstimmung mit denen an der TVR. Die Reizerfolge der afferenten elektrischen Vagusreizung wurden sehr verschiedenartig beeinflußt. Nur bei einem einzigen der 5 Tiere verstärkte sich nach Veratrin der exspiratorische Reizeffekt erwartungsgemäß im Sinne einer Zunahme der exspiratorischen Verschiebung der Atemlage und des Eintretens eines kurzdauernden exspiratorischen Atemstillstandes.

Teilweise stellte sich eine „procainartige" Abschwächung des exspiratorischen Reizerfolges ein.

Die zentrale Miterregung inspiratorischer Atemmechanismen durch Veratrin ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Im Kreislauf sind z. B. nicht nur parasympathisch bedingte (zentral oder peripher ausgelöste) Blutdrucksenkungen bekannt, sondern auch pressorische Reaktionen, die vor allem nach Ausschaltung des afferenten Vagus (Bezold u. Hirt, Jarisch u. Richter, Zipf u. Bussen) und nach Carotisabklemmung (Zipf u. Bussen) stärker hervortreten. Krayer (S. 402) nimmt (neben einer peripheren) eine zentral ausgelöste Freisetzung von Adrenalin an. Es ist also an eine zentrale Miterregung sympathischer Zentren zu denken.

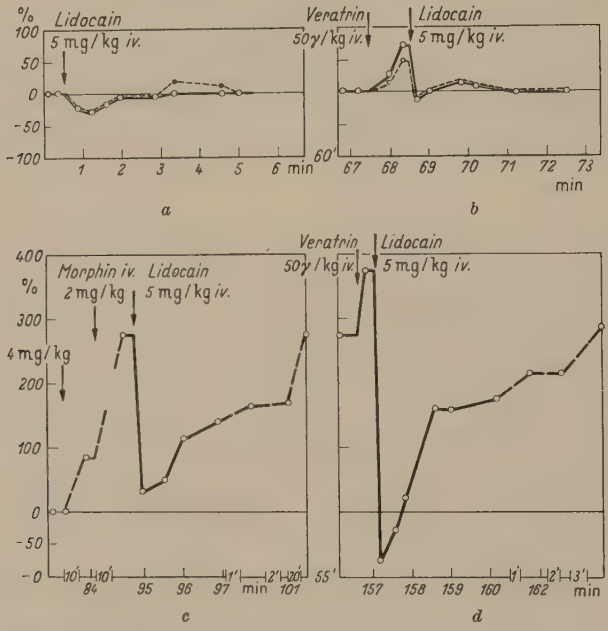



Abb. 9 *a—d*. Verkürzung der exspiratorischen Trachealverschlußreaktion nach Head durch Lidocain-Hydrochlorid. Kaninchen, ♀, 2 kg, Urethannarkose.

Wenn die peripheren vagalen Receptoren (z. B. durch doppelseitige Vagotomie) abgetrennt werden, fällt die Möglichkeit einer peripheren Receptorensensibilisierung weg, somit auch die gesteigerte und kontinuierliche afferente vagale Impulsaussendung zu den Zentren. Letztere ist sonst in der Lage, eine begleitende zentrale sympathisch betonte Erregung zu übertönen und dem Wirkungsbilde vorwiegend einen parasympathischen Charakter aufzuprägen (Bezold-Jarisch-Reflex, exspiratorisch betonte TVR).

Bei der elektrischen Reizung des zentralen Vagusstumpfes kann unter Veratrin eine periphere Receptorensensibilisierung nicht eintreten. Die Möglichkeit ist also gegeben, daß zentral erregte Inspirationsmechanismen im Wirkungsbild in den Vordergrund treten und der exspiratorische Reizerfolg gegenüber normal tatsächlich „procainartig" abgeschwächt

wird. Damit wird auch verständlich, daß in unseren Versuchen *Procain* (5 mg/kg i.v.) die inspiratorisch aktivierende Veratrinwirkung eher verstärkte als abschwächte.

Wir haben somit einen deutlichen Gegensatz: einerseits an der TVR die sichere exspiratorische Aktivierung und die sichere Aufhebung durch Procain, andererseits die verschiedenartige, teilweise procainähnliche Veratrinwirkung auf den Effekt der afferenten elektrischen Vagusreizung und die hierbei eher verstärkende als abschwächende Procainwirkung. Gerade daraus glauben wir schließen zu dürfen, daß die mit der exspiratorisch aktivierenden TVR erhobenen Veratrin- und Procainbefunde sich überwiegend durch Beeinflussung der Lungendehnungsreceptoren erklären lassen.

Für *Morphin* konnte erwartet werden, daß die „pontine Enthemmung" der einfließenden elektrischen Reizimpulse den exspiratorischen Effekt der elektrischen Reizung verstärkte. Der exspiratorische Atemstillstand wurde nach Morphin entsprechend dieser Erwartung verlängert oder erstmalig herbeigeführt. Uneinheitlich war aber die Wirkung hinsichtlich der Bradypnoe und der exspiratorischen Verschiebung der Atemlage (im Gegensatz zu der zuverlässigen Morphinwirkung auf die exspiratorische TVR). Ebenso uneinheitlich war die Wirkung von *Procain* (5 mg/kg i.v.) gegenüber dem durch Morphin veränderten elektrischen Reizeffekt. Es wirkte sowohl abschwächend, als auch verstärkend. Vergleicht man damit die prompte und sichere Reduktion der (durch Morphin) „enthemmten" exspiratorischen TVR durch Lokalanaesthetica, dann ergibt sich auch hier die Annahme, daß es mehr die Dämpfung der Receptorentätigkeit als die zusätzliche zentrale Hemmwirkung des Procains ist, die die TVR reduziert.

*Zusammengefaßt* liefern die Ergebnisse aus den Versuchen mit afferenter elektrischer Vagusreizung den starken Hinweis, daß die Reduktion der normalen, der durch Veratrin sensibilisierten und der durch Morphin enthemmtenTVR in der Hauptsache durch Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren zustande kommt.

## Besprechung.

Die Trachealverschlußreaktion (TVR) nach Head ist ebenso wie der Hering-Breuersche Reflex (proprioceptive, reflektorische, vagale Atemsteuerung) und die von Hess beobachtete Abhängigkeit der Zwerchfellspannung das Ergebnis eines Lungenvolumenreflexes. Sie alle sind an die Unversehrtheit des Lungenvagus und an die normale Funktion der Lungendehnungsreceptoren gebunden, die bei ihrer Erregung den Zentren afferente Aktionsimpulse zuleiten (Keller u. Loeser, sowie Adrian). Beiderseitige Vagotomie bringt die TVR zum Verschwinden. Lokale Anaesthesie der Pleura mit Procain (Lanz), in der, bzw. in deren unmittelbarer Nähe etwa 60% der Dehnungsreceptoren liegen (Weidmann, Berde u. Bucher) schwächt die exspiratorisch aktivierende TVR stark ab. Die Lungendehnungsreceptoren sind damit zwar als die Impulsgeber für den Lungenvolumenreflex erwiesen, aber es besteht die

Möglichkeit, daß der Reflex auch an anderen Orten, besonders zentral beeinflußt werden kann. Schon die Narkose spielt eine Rolle und schwächt mit zunehmender Tiefe die exspiratorische TVR ab. Morphin wiederum, oder ihm verwandte Stoffe (Bucher 1952) verstärken die exspiratorisch aktivierende TVR, wahrscheinlich durch Enthemmung der Vagusafferenzen in der caudalen Ponshälfte.

Auch für die *Lokalanaesthetica* müssen wir eine zentrale Wirkungskomponente diskutieren, die der Dehnungsreceptorenanaesthesie eventuell parallel läuft.

Für den lokalanaesthetisch wirksamen Körper Diäthylamino-äthyl-tetrahydrofluoranthen (D.T.F.) wird eine solche zentrale Beeinflussung angenommen und zwar wahrscheinlich in der Pons und im Sinne einer Verstärkung der vagalen Inspirationsbereitschaft (analog einem Hirnstammschnitt im rostralen Drittel der Pons (Rickenbach u. Meier). Im letzteren liegen bekanntlich zur Hauptsache die inspiratorisch hemmenden Mechanismen. Ihre Abschaltung wird ergänzt durch die zusätzliche endoanaesthetische Wirkung auf die Dehnungsreceptoren.

Für Procain weist Bucher (1947) zwar auf eine gewisse zeitliche Parallelität zwischen Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden TVR und elektrophysiologisch nachgewiesener Dehnungsreceptorenanaesthesie hin. Eine solche fehlte aber hinsichtlich der Intensität beider Wirkungen. Von früheren Untersuchern wurde nur ein zentraler Angriff der Lokalanaesthetica hervorgehoben, im Sinne einer Beschleunigung und Vertiefung der Atmung bei kleinen Dosen, Lähmung des Atemzentrums bei höheren Gaben[1]. Betrachtet man aber die *Wirkung der Lokalanaesthetica auf die Normalatmung* von einer Beeinflussung der Dehnungsreceptoren her, dann ergibt sich eine weitere Deutungsmöglichkeit. Die inspiratorische Verschiebung und die Atembeschleunigung lassen sich zumindest zusätzlich aus der Dämpfung der Vagusafferenzen erklären.

Wir haben nach allem eine Mischwirkung peripher und zentraler Art bei den üblichen Lokalanaesthetica vor uns. Daß die Verkürzung der exspiratorisch aktivierenden TVR durch Lokalanaesthetica zu einem wesentlichen Teile der Dehnungsreceptorenanaesthesie zuzuschreiben ist, dafür spricht zunächst vor allem die Aufhebung der Veratrinwirkung und Desensibilisierung der Receptoren, sogar unter die Ausgangslage. Es spricht dafür aber fehlende Übereinstimmung zwischen den Befunden mit Veratrin, Morphin und Procain bei der TVR und bei der afferenten elektrischen Vagusreizung, auch wenn diese Verschiedenheiten nicht für einen direkten Beweis verwertbar sind. Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß in der Reduktion der exspiratorischen TVR durch Lokalanaesthetica endoanaesthetische Wirkungsanteile vertreten sind. Diese Dehnungsreceptorenanaesthesie erniedrigt bei allen Variationen der TVR die Afferenzen auf den Stand eines geringeren Lungenvolumens und verstärkt damit den im inspiratorischen Sinne wirksamen Vaguseinfluß.

[1] Lit. siehe bei Laubender.

Nach den von uns gemachten Erfahrungen und Überlegungen *kann man die Trachealverschlußreaktion nach* Head *als eine wertvolle Hilfsreaktion zum Nachweis endoanaesthetischer Wirkungen betrachten.* Sie erlaubt, aus einer größeren Zahl von Stoffen mit fraglicher endoanaesthetischer Wirkung die wirksamsten herauszusuchen, um sie endgültig durch die elektrophysiologische Methode genauer zu definieren. Sie hat den Vorteil, daß die Phasenänderungen ausmeßbar und graphisch darstellbar sind. Solche quantitativen Messungen sind bekanntlich bei der elektrophysiologischen Methode nur für Präparate aus Einzelfasern oder sehr wenigen Fasern durchführbar. Aus der Zeit/Wirkungskurve läßt sich die endoanaesthetische Wirkungsdauer sogar genauer bestimmen, als uns dies mit der elektrophysiologischen Methode bisher möglich war (Zipf u. Miestereck). Die mit der TVR ermittelten Wirkungszeiten liegen dadurch etwas höher, als früher angegeben. Wir konnten Procain wegen seiner kurzen Wirkungsdauer fast immer vorausprüfen, um dann die anderen Lokalanaesthetica am gleichen Tier in den Vergleich zu setzen. Dies wird ermöglicht, weil die Ester-Lokalanaesthetica leicht hydrolysiert und inaktiviert werden. Aber auch die Nichtester vom Lidocaintyp wirken nur kurz; sie haften nur wenig an den fraglichen Wirkungsorten. Anders liegen die Verhältnisse, wenn es sich um stark haftende und kumulierende Lokalanaesthetica handelt, deren Inaktivierungs- bzw. Ausscheidungszeiten nicht bekannt sind. Hier sind nur Einzelbestimmungen von quantitativem Wert.

## Zusammenfassung.

Die exspiratorisch aktivierende Trachealverschlußreaktion (TVR) nach Head ist als Vor- und Hilfstest brauchbar, um den elektrophysiologischen Nachweis endoanaesthetischer Wirkungen von intravenös verabreichten Lokalanaesthetica zu ergänzen. Geeignete Versuchstiere sind Kaninchen, Katzen und Meerschweinchen in Narkose.

Durch intravenöse Verabreichung von Veratrinsulfat (Receptorensensibilisierung) oder von Morphinhydrochlorid (pontine Enthemmung) oder von beiden zusammen läßt sie sich variieren und erheblich verstärken.

Nach intravenöser Verabreichung von Procain, Tetracain, Lidocain und Hostacain wurde die exspiratorisch aktivierende TVR in allen ihren vier Variationen auf oder unter die Ausgangslage verkürzt. Der Einfluß dieser Mittel kann in Form von Zeit/Wirkungskurven dargestellt werden.

Die Wirkung läßt sich durch Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren erklären. Ein zusätzlicher zentraler Wirkungsanteil der Lokalanaesthetica ist nach Versuchen mit elektrischer Reizung des afferenten Lungenvagus im Gesamteffekt anzunehmen.

## Literatur.

Adrian, E. D.: J. of Physiol. **79**, 332 (1933). — Bezold, A. v., u. L. Hirt: Unters. aus dem physiol. Labor. Würzburg **1**, 73 (1867). — Bucher, K.: Pflügers Arch. **246**, 307 (1943). — Helvet. physiol. Acta **2**, 5 (1944). — Helvet. physiol. Acta **5**, 348 (1947). — Verh. Schweiz. Physiol. Juni 1942; zit. nach Bucher (1952). — Reflektorische Beeinflußbarkeit der Lungenatmung. Wien: Springer 1952. — Bucher, K., u. J. Schneider: Helvet. physiol. Acta **4**, 459 (1946). — Fischlewitz, J.: Helvet. physiol. Acta **6**, 455 (1948). — Fischlewitz, J., u. K. Bucher: Experientia (Basel) **4**, 196 (1948). — Head, H.: J. of Physiol. **10**, 1, 279 (1889). — Hering, E., u. R. Breuer: Sitzgs.ber. Akad. Wiss. Math.-Naturwiss. Kl. II **58**, 909 (1868). — Hess, W. R.: Pflügers Arch. **226**, 198 (1931). — Jarisch, A., u. H. Richter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 355 (1939). — Josenhans, W.: Pflügers Arch. **258**, 296 (1954). — Keller, Ch. J., u. A. Löser: Z. Biol. **89**, 373 (1929). — Killian, H., u. H. Weese: Die Narkose. Stuttgart: Thieme 1954. — Krayer, O., and G. H. Acheson: Physiologic. Rev. **26**, 383 (1946). — Kreppel, E., et H. F. Zipf: Arch. Internat. Pharmacodynamie **101**, 279 (1955). — Lanz, U.: Helvet. physiol. Acta **10**, 62 (1952). — Laubender, W.: Heffter Hdb. exper. Pharmakologie, Erg. werk **8**, Berlin: Springer 1939. — Meier, R.: Helvet. med. Acta **7**, 30, Suppl. VI (1940/41). — Meier, R., H. J. Bein u. H. Helmich: Experientia (Basel) **5**, 484 (1949). — Rice, H. V.: Amer. J. Physiol. **124**, 535 (1938). — Rickenbach, K., u. R. Meier: Helvet. physiol. Acta **6**, 863 (1948). — Weidmann, H., B. Berde u. K. Bucher: Helvet. physiol. Acta **7**, 476 (1949). — Wyss, O. A. M.: Pflügers Arch. **242**, 215 (1939); **243**, 457 (1940); J. of Neurophysiol. **10**, 315 (1947). — Zipf, H. F.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1587. — Zipf, H. F., u. G. Bussen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 231 (1952). — Zipf, H. F., u. H. Miestereck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 472 (1953).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Bln.-Dahlem,
Inst. f. Veterinär-Pharmakologie u. exper. Pathologie d. Freien Univ. Bitterstr. 14—16.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 377—382 (1955).

Aus der Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. F. Doenecke).

# Strömungscalorimetrische Untersuchungen zur Beeinflussung der peripheren Wärmeabgabe und des Energieumsatzes durch synthetische Hibernatoren.

Von

Wolfgang Benstz.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 6. Mai 1955.)*

Unter stationären Bedingungen kann die von der Körperoberfläche des homiothermen Organismus je Flächeneinheit abgegebene Wärmemenge zugleich als Maß für die Durchblutung angesehen werden (J. Aschoff[1], Hensel[10]). Der Wärmestrom hängt unter anderem ab von der Wärmebildung und wird als Funktion der Körpertemperatur und des Energieumsatzes betrachtet (Benedict[2], Pfleiderer[21], Pfleiderer u. Büttner[22], Pichotka[23] u. a.). Unter Berücksichtigung dieser Beziehungen und zur Erzielung quantitativer Ergebnisse schien es von Interesse, durch strömungscalorimetrische Messung die Wirkung einiger in der Klinik häufig verwendeter synthetischer Hibernatoren — meist handelt es sich um Phenothiazinderivate — auf Wärmeabgabe und Energiestoffwechsel des Menschen bei fortlaufend registrierender Methodik zu untersuchen. Die Beeinflussung vegetativer Regulationen durch die genannten Substanzen geht aus zahlreichen Mitteilungen hervor, ein einheitliches Wirkungsbild, insbesondere im Hinblick auf den Wärmehaushalt hat sich jedoch noch nicht ergeben[19, 13, 15, 26, 27, 3, 3a].

## Methodik.

Die Messung der Wärmeabgabe erfolgte calorimetrisch an der Innenfläche der rechten Hand als einem Ort besonders guter und leicht reagierender Durchblutung[6, 18, 28, 12]. Zur Registrierung des kontinuierlich abgegebenen Wärmestromes fand der von Hensel[10, 11] beschriebene Vascalor* in Verbindung mit einem Linienschreiber Verwendung. Im Prinzip wird bei dieser Methode die abgegebene Wärme durch eine dünne Metallplatte von fließendem Wasser konstanter Temperatur und Strömungsgeschwindigkeit aufgenommen und die entstehende Temperaturänderung thermoelektrisch gemessen. Die hohe Empfindlichkeit des Gerätes erlaubte die quantitative Erfassung einer Differenz von $10^{-4}$ cal/cm$^2$/sec, so daß es besonders geeignet erschien,

* Hersteller-Firma: Hartmann & Braun, Frankfurt a. M.

vegetative Einflüsse auf Wärme- und Kreislaufregulation zu beobachten. Ein Sechsfarbenschreiber diente der synchronen Aufzeichnung von thermoelektrisch gemessenen Haut- und Rectaltemperaturen. Die Energiebilanz wurde mit Hilfe eines nach dem Wärmeleitfähigkeitsprinzip arbeitenden Grundumsatzgerätes errechnet. Blutdruck- und Pulsfrequenzmessung erfolgten in der üblichen Weise. Die Untersuchungen wurden an Gruppen von jeweils 10 stoffwechselgesunden Versuchspersonen ohne Zeichen von Kreislauf- oder Ateminsuffizienz unter Grundumsatzbedingungen vorgenommen. Auf eine Konstanthaltung der Raumtemperatur von $25 \pm 0{,}5°$ C („Behaglichkeitsbereich") wurde besonderer Wert gelegt. Die Applikation der Präparate erfolgte intravenös bzw. intramuskulär.

## Ergebnisse.

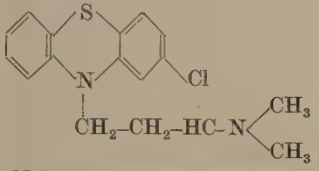
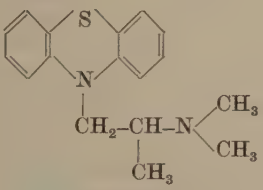
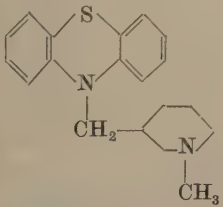
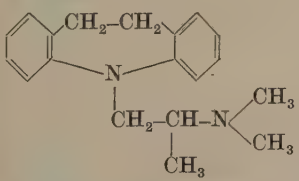
Die Wirkung der verwendeten Präparate auf den $O_2$-Verbrauch ist im therapeutischen Dosierungsbereich (vgl. Tabelle), — der allerdings wesentlich tiefer liegt als die im Tierexperiment angewendeten Dosierungen[4] — relativ gering. *Megaphen* und *Atosil* scheinen eine gewisse Steigerung der Stoffwechsellage bei 25 bzw. 50 mg pro 100 kg Körpergewicht herbeizuführen, während *Pacatal* und G *22150*, ein Iminodibenzylderivat*, in derselben Dosierung (25 mg i.v.) eine geringe Stoffwechselsenkung bewirken. Hierbei tritt die angestrebte Dämpfung des Sensoriums in allen Fällen in etwa gleicher Form und Stärke in Erscheinung. Im Gegensatz zu früher mitgeteilten Ergebnissen interferometrischer Gasanalysen am Kleintier (Ratte)[4], wonach der Umsatz*senkung* bei niederer Dosierung von synthetischen Antihistaminen eine *Steigerung* nach höherer Dosierung gegenüberstand, konnten wir *beim Menschen* in den vorliegenden Untersuchungen ähnlich *ausgeprägte Stoffwechseländerungen* nicht beobachten. Ob dies als Zeichen einer unterschiedlichen Reaktion kleiner und großer Versuchsobjekte angesehen werden kann[2], läßt sich wegen der Dosierungsunterschiede nicht mit Sicherheit beurteilen.

Größere Wirkungsunterschiede als beim Energieumsatz zeigen sich bei der graphischen Registrierung der peripheren Wärmeströmung unter stationären Bedingungen (Abb. 1). Während Megaphen eine signifikante Zunahme der Wärmeabgabe, verbunden mit der für dieses Präparat charakteristischen Kreislaufumstellung mit Hypotonie und Tachycardie hervorruft[7, 8, 9, 16], ist die Wirkung von Atosil in der *Art* zwar ähnlich, im *Ausmaß* aber wesentlich geringer. Pacatal und das Iminodibenzylderivat vermindern die Wärmeabgabe bzw. die periphere Durchblutung, ohne Blutdruck- und Pulsfrequenz merklich zu beeinflussen. Die besonders nach Megaphen zu beobachtende Kreislaufkollapsneigung stellt sich nach den zuletzt genannten Präparaten nicht ein.

Die Mittelwerte der Hauttemperatur[22], gemessen an beiden Hand- und Fußrücken, lassen nach Megaphen durchschnittlich einen Anstieg

* Die Substanz wurde entgegenkommenderweise durch I. R. Geigy-A.G. zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. *Wirkung sog. „Hibernatoren" auf Wärmeabgabe und Energieumsatz.*

| Präparat | Anzahl | Dosis mg/100 kg | *Wärmestrom (Q)* (re. Handfläche) Mittelw. d. Diff. vor u. nach der Inj. cal/cm²/sec. | *Energieumsatz* Mittelw. der prozentualen Diff. vor u. 30 min nach Injektion. | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | % | σ |
| *Megaphen*  | 10 | 10 | | $-6{,}10 \pm 12{,}5$ | 3,6 |
| | 10 | 25 | 0,005 | $+6{,}17 \pm 9{,}47$ | 4,3 |
| (N-Dimethylamino-3-chlor-phenothiazin) | | | | | |
| *Atosil*  | 10 | 25 | | $-1{,}85 \pm 7{,}3$ | 1,6 |
| | 10 | 50 | + 0,003 | $+2{,}54 \pm 6{,}2$ | 2,8 |
| (N-Dimethylamino-propyl-phenothiazin) | | | | | |
| *Pacatal*  | 10 | 25 | — 0,004 | $-1{,}43 \pm 2{,}8$ | 1,2 |
| (N-Methyl-piperidyl-3-methyl-phenothiazin) | | | | | |
| *G 22 150*  | 10 | 10 | | $-2{,}80 \pm 6{,}3$ | 1,7 |
| | 20 | 25 | — 0,005 | $-1{,}92 \pm 9{,}2$ | 2,0 |
| (N-Dimethylamino-propyl-iminodibenzyl) | | | | | |
| *NaCl Physiol.* | 10 | 1 cm³ | 0 | $-1{,}65 \pm 4{,}4$ | 1,2 |

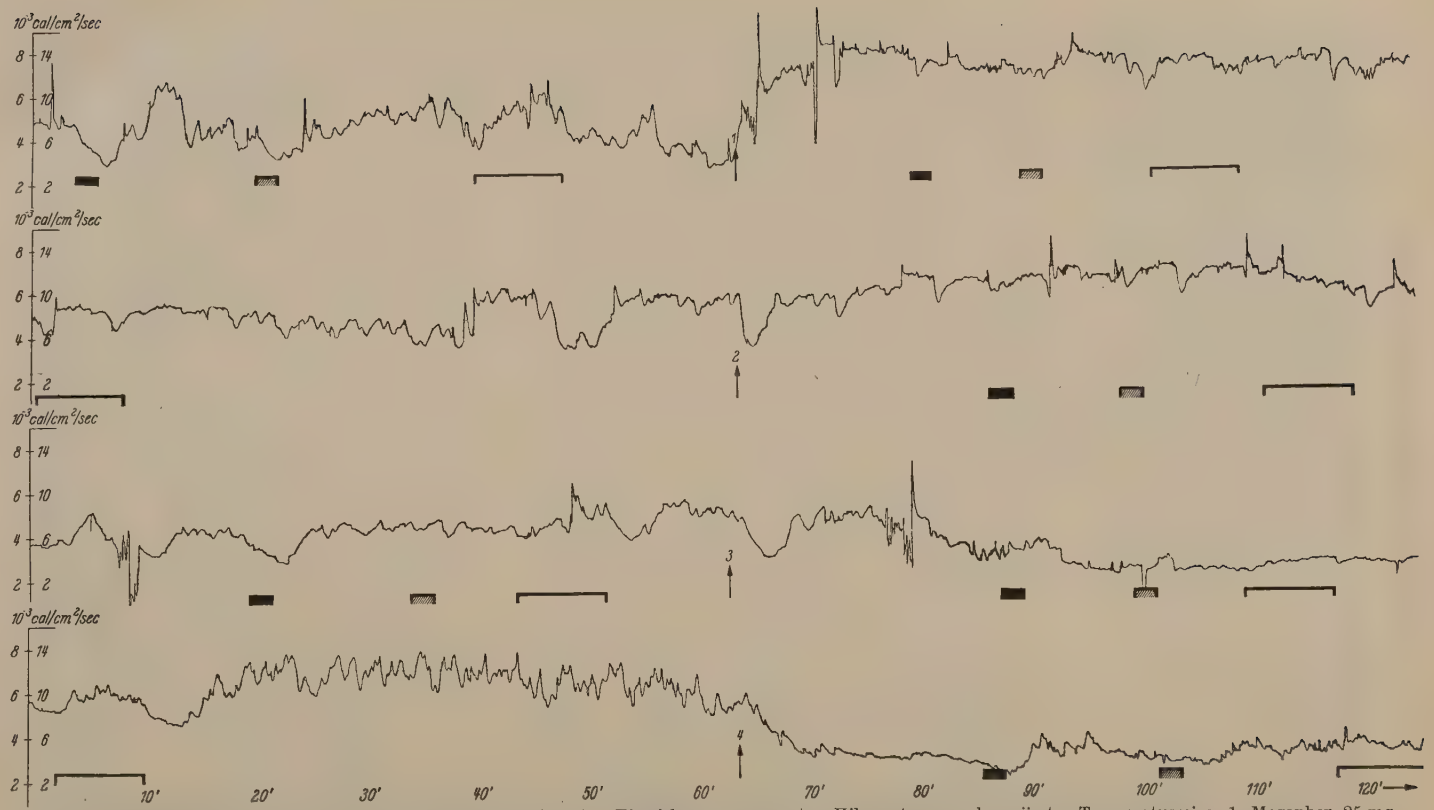



Abb. 1. Registrierung des Wärmestromes (re. Handfläche) unter Einwirkung sogenannter Hibernatoren und variierter Temperaturreize. 1. Megaphen 25 mg i.v. 2. Atosil 50 mg i.m. 2. Pacatal 25 mg i.v. 4. g 22150 50 mg i.v. ■ Handbad 2 min im Wasser von 0°C. ▨ Handbad 2 min im Wasser von 42° C. ▭ Heizkasten 8 min über bd. unt. Extremitäten.

um 1,5—2,0° C erkennen, gleichzeitig sinkt die Rectaltemperatur um 1—1,4° C (Kreislaufumstellung). Nach Atosil und Pacatal sind signifikante Unterschiede der Haut- und Rectaltemperaturen nicht festzustellen. Nach dem Iminodibenzylderivat sinken die Hauttemperaturen durchschnittlich um 0,5—1,0° C bei konstant bleibender Rectaltemperatur. Allen Substanzen gemeinsam ist eine im Kurvenverlauf deutlich werdende Einengung der charakteristischen rhythmischen Schwankungen der Wärmeströmung und die Dämpfung der Reaktionen auf variierte Temperaturreize (kurze, heiße und kalte Handbäder auf der kontralateralen Seite; Heizkastenbestrahlung der unteren Extremitäten von 8 min Dauer).

Die Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse läßt eine von der chemischen Struktur der Präparate abhängige, verschiedenartige Beeinflussung der peripheren Wärmeabgabe bzw. Durchblutung der Haut- und Rectaltemperaturen und des Energieumsatzes erkennen, wobei die Wirkung aller Präparate auf das Sensorium als weitgehend identisch anzusprechen ist. Für eine *zentrale* Wirkung der Phenothiazine und des Iminodibenzylderivates auf die enggekoppelte Wärme- und Kreislaufregulation spricht die Änderung des strömungscalorimetrisch gewonnenen Gesamtkurvenbildes und die darin zum Ausdruck kommende verminderte Reaktion auf Temperaturreize. Der Energieumsatz erfährt in Parallele zur Änderung der Wärmeströmung eine gleichsinnige Steigerung bzw. Senkung. Die relativ geringe Differenz der Umsätze gegenüber der Ausgangslage stützt bei Berücksichtigung des gegensinnigen Verhaltens der Haut- und Kerntemperaturen die Auffassung, daß durch die verwendeten Hibernatoren eine primäre Änderung der peripheren Durchblutung (Blutverteilungsänderung) herbeigeführt wird. Eine unmittelbare Beeinflussung des Energiestoffwechsels als mögliche Ursache der veränderten Wärmeabgabe kann demnach in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern[29, 30] ausgeschlossen werden.

Besondere klinische Beachtung verdient die unterschiedliche Kreislaufwirkung der Substanzen im Hinblick auf die häufig empfohlene Verwendung bei Kreislauffunktionsstörungen auf vegetativer Basis, sowie vor allem bei Coronarinsuffizienz, Herzinfarkt und bei „potenzierter Narkose“[24, 25, 20, 5, 17].

## Zusammenfassung.

Bei strömungscalorimetrischen Messungen an der Handfläche stoffwechsel- und kreislaufgesunder Versuchspersonen traten nach synthetischen Hibernatoren (Megaphen, Atosil, Pacatal und G 22150) bei weitgehend ähnlicher Wirkung auf das Sensorium deutliche Unterschiede im Verlauf des fortlaufend registrierten peripheren Wärmestroms auf. Die Änderungen gleichzeitig gemessener Haut- und Rectaltemperaturen,

des Blutdrucks und der Pulsfrequenz lassen eine Kreislaufumstellung als Ursache der veränderten Wärmeabgabe und eine zentrale Wirkung auf die Vasomotorik annehmen. Der Grundumsatz ändert sich in so geringem Ausmaß, daß eine primäre Beeinflussung des Sauerstoffverbrauches durch die verwendeten Pharmaka im thera peutischen Dosisbereich nicht wahrscheinlich ist.

## Literatur.

[1] Aschoff, J.: Pflügers Arch. **247**, 469 (1943); **249**, 125 (1948). — [2] Benedict, F. G., u. C. G. Benedict: Biochem. Z. **186**, 278 (1927). — [3] Benstz, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 59. Kongr. 1953. — [3a] Benstz, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 61. Kongr. (1955). — [4] Benstz, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 575 (1954). — [5] Brehmer, G.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1724. — [6] Clara, M.: Die arteriovenösen Anastomosen. Leipzig: J. A. Barth 1938. — [7] Duesberg, R.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. München 1954. — [8] Grosse-Brockhoff, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 63 (1954). — [9] Heinecker, R.: Klin. Wschr. **1954**, 803. — [10] Hensel, H.: Z. exper. Med. **117**, 587 (1951); Z. Kreislaufforsch. **41**, 251 (1952). — [11] Hensel, H.: Dtsch. Physiologentagung Homburg/Saar 1953 Ber. Physiol. **162**, 360 (1954). — [12] Hoff, F.: Erg. inn. Med. **33**, 195 (1928). — [13] Hugenard, P.: Anaesth. et Analg. 2 (1952). — [14] Huidobro, F.: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 308 (1954). — [15] Jaulmes, Ch. u. a.: Académie des siences **234**, 372 (1952). — [16] Kleinsorge, H.: Ärztl. Wschr. **1954**, 271. — [17] Koss, F. H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 58 (1954). — [18] Lewis, Th.: Gefäßstörungen der Gliedmaßen. Leipzig: Thieme 1938. — [19] Laborit, H., u. a.: Presse méd. **1952**, 206. — [20] Norpoth, L., u. a.: Dtsch. med. Wschr. **1954**, 189. — [21] Pfleiderer, H.: Z. exper. Med. **7**, 245 (1933). — [22] Pfleiderer, H., u. K. Büttner: Grundlagen der Hautthermometrie. Leipzig: J. A. Barth 1935. — [23] Pichotka, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 398 (1933); **222**, 81 (1954). — [24] Ratschow, R.: Therapiewoche 13/14 (1952/53). — [25] Ratschow, R.: Die Medizinische **1953**, 281. — [26] Rizzi, R.: Anaesthesist **3**, 179 (1954). — [27] Stropeni, L., u. a.: Anaesthesist **3**, 183 (1954). — [28] Sunder-Plasmann, P.: Durchblutungsschäden. Stuttgart: Enke 1943. — [29] Thauer, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 80 (1954). — [30] v. Werz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmkol. **222**, 78 (1954).

Dr. W. Benstz, Homburg/Saar, Mediz. Klinik d. Univ. d. Saarlandes.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 383—394 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn).

# Zur Frage der Avertinwirkung auf die Cardiazolentgiftung.

Von
F. Hahn und R. Schunk.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 18. Juni 1955.)*

Für die bei Tieren in Avertinnarkose nach genügend hohen Cardiazolgaben auftretenden Spätkrämpfe (Gros u. Haas; Zipf u. Mertins; Klein; Lendle) ergibt sich als nächstliegende Erklärung eine aus der Flüchtigkeit der Avertinwirkung resultierende mangelhafte zeitliche Kongruenz zwischen Narkosedauer und Cardiazolwirkung. Diese Erklärung hat Adam für die auch bei Chloralhydratnarkose zu beobachtenden Cardiazolspätkrämpfe gegeben. Nach Gros u. Haas sowie Biehler besteht aber auch die Möglichkeit, daß das Avertin durch seine hepatotrope Wirkung auf die von manchen Autoren (Esser u. Kühn; Dille u. Seeberg; Tatum u. Kozelka) in die Leber verlegte Cardiazolentgiftung hemmend wirkt.

Im folgenden soll diese Hypothese zunächst durch chemische Bestimmung des Cardiazolgehaltes in Blut und Leber zu verschiedenen Zeiten nach der Cardiazolzufuhr geprüft werden. Da wegen der hohen Cardiazoldosen Vergleichsversuche an normalen Tieren nicht möglich waren, wurden Kontrollen mit anderen Narkosearten durchgeführt. Hierzu wurde Evipan benutzt, weil es ebenfalls ein Kurznarkoticum ist; außerdem Urethan als lange wirkendes Narkoticum.

## I. Chemische Cardiazolbestimmungen an Ratten.

*Methodik.* Weiße Ratten erhielten als Versuchstiere i. p. jeweils zu Beginn des Versuches entweder 100 mg/kg Evipan oder 300 mg/kg Avertin oder 1 g/kg Urethan. 5 min nach Eintritt der Seitenlage gaben wir bei einer Versuchsgruppe 250 mg/kg, bei einer zweiten 100 mg/kg Cardiazol i.v., wobei wir die 2,5 bzw. 1%ige Lösung möglichst gleichmäßig in einem Zeitraum von 2 min spritzten. Die Versuchstiere wurden nach 1 oder 2, bei der höheren Cardiazoldosis auch nach 3 oder 6 Stunden getötet und durch einen Halsschnitt in ein Schälchen entblutet; die Leber wurde herausgenommen. Für die späteren Analysen waren bisweilen Nachinjektionen der Narkotica erforderlich, worüber weiter unten berichtet wird. Bei dem folgenden Arbeitsgang der Extraktion und der chemischen quantitativen Cardiazolbestimmung hielten wir uns, abgesehen von einigen Abweichungen, an die von Dister angegebene Methode.

Die abgewogene Menge (etwa 2—10 g) des cardiazolhaltigen organischen Materials (Blut und Leber) wird in einem Mörser mit feinem Seesand verrieben, bis eine homogene Masse entsteht. Nach Hinzufügen von 10 $cm^2$ Aqua dest. und später 25 $cm^3$ 20%iger Trichloressigsäure setzt man das Verreiben mindestens 10 min fort und gibt dann die überstehende Flüssigkeit vorsichtig in ein Filter. Der Vorgang wird noch zweimal mit je 10 bis 20$cm^3$ Trichloressigsäure unter weiterem Verreiben wiederholt. Das gesammelte Filtrat wird durch Zusatz von 20%iger Sodalösung bis zu einem $p_H$ 8—9 alkalisiert, etwa die gleiche Menge Chloroform hinzugesetzt und gründlich im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Das Cardiazol geht dabei in die Chloroformphase über, die man in eine Abdampfschale laufen läßt. Das Ausschütteln des wäßrigen Extraktes wird noch zweimal mit der halben Chloroformmenge wiederholt. Den Chloroformauszug läßt man bei Zimmertemperatur eindampfen. Da Cardiazol einen Siedepunkt von 59° hat, ist Anwendung von Wärme zu vermeiden, weil hierdurch erhebliche Verluste entstehen können (Arnold). Zur Beschleunigung des Abdampfens hat sich bei uns das Herüberleiten eines Luftstromes mit dem Föhn bewährt. Der vollständig getrocknete Rückstand auf der Abdampfschale wird mit 3 · 5 $cm^3$ Chloroform ausgewaschen. Dieses gibt man unter nochmaligem Filtrieren in ein kleines Becherglas und läßt es (bei Zimmertemperatur) eindampfen. Der Rückstand wird mit 2 $cm^3$ Aqua dest. quantitativ aufgenommen. Die darin enthaltene Cardiazolmenge läßt sich nach dem folgenden Verfahren ermitteln.

In Präcipitinröhrchen, die etwa 4 $cm^3$ fassen, werden die 2 $cm^3$ der zu bestimmenden Cardiazollösung gegeben. Die Röhrchen werden in Eis gestellt und nach einigen Minuten 1 $cm^3$ Disters'ches Reagens hinzugefügt (10 g Ammonchlorid, 1 g Natriumsulfit und 1,25 g Cuprochlorid pro analysi in 100 $cm^3$ Aqua dest.). Nach Verschluß mit Gummistopfen schüttelt man einmal um und läßt die Röhrchen weiterhin in Eis stehen. Im Lauf der nächsten Stunde wiederholt man das Umschütteln zweimal. Es entwickelt sich dabei langsam ein weißer kristalliner Niederschlag durch Kupfer-Cardiazol-Komplexbildung. Der Niederschlag wird nun scharf zentrifugiert (bei 6000 Umdrehungen, etwa 10 min), bis er möglichst fest am Boden haftet. Die überstehende klare Flüssigkeit gibt man durch einen kleinen Trichter mit hartem Filterpapier, um beim Dekantieren evtl. verlorengehende Niederschlagsmengen zurückzuhalten. Der Niederschlag wird mit 1 $cm^3$ 1%iger Essigsäure versetzt, die man mit vorher aufgekochtem Aqua dest. frisch herstellt, und nach Umschütteln erneut zentrifugiert. Nach 10 min gibt man die überstehende Flüssigkeit durch das gleiche Filterpapier, wäscht wieder mit Essigsäure aus, zentrifugiert und filtriert nochmals. Das Filterpapier wird im Anschluß daran noch mit 3 · 1 $cm^3$ Essigsäure zur restlosen Entfernung nicht komplexgebundener Cu-Ionen ausgewaschen. Zu dem Niederschlag in dem Röhrchen gibt man jetzt 2 $cm^3$ heiße Kaliumpersulfatlösung (1%ig) und schüttelt um bis zur Auflösung. Diese Lösung gibt man durch das gleiche Filter in ein 10 $cm^3$-Meßkölbchen. Das Filter spült man nochmals mit 1 $cm^3$ heißer Kaliumpersulfatlösung durch, um evtl. im Filter befindliche ungelöste Kristalle des Komplexes zu lösen. In das Röhrchen gibt man 2 $cm^3$ konzentrierte Ammoniaklösung und schüttet diese ebenfalls durchs Filter. Nachspülen von Röhrchen und Filter mit Aqua dest. bis zur Auffüllung des 10 $cm^3$-Meßkölbchens. Es entsteht eine blaugefärbte Lösung, deren Farbintensität von der Zahl der vorher komplex an Cardiazol gebundenen Cu-Ionen abhängig ist. Da das Verhältnis von Cu zu Cardiazol im Komplex konstant ist ($8\ C_6H_{10}N_4 + 7\ CuCl_2$), läßt sich auf diese Weise das Cardiazol indirekt colorimetrisch bestimmen. Die Angabe Disters, daß 1 mg Cardiazol 0,807 mg $CuCl_2$ entspricht, fanden wir auf Grund unserer Eichkurven mit reinen Cu-Lösungen und vergleichender Analyse eingewogener Cardiazolmengen bestätigt. Die colorimetrische Bestimmung führten wir mit einem „Medeor"-Elektrocolorimeter bei Filter 578 m$\mu$ und 3 cm Schichtdicke

durch. Für den Meßbereich von 0,5—5 mg Cardiazol läßt sich durch Multiplikation des Extinktionswertes mit dem Faktor 5,25 direkt die Cardiazolmenge in mg angeben.

In Kontrollversuchen, bei denen wir eine eingewogene Cardiazolmenge in Lösung zu Rattenleber oder -blut hinzusetzten, fanden wir bei der chemischen Bestimmung 93—99% wieder. Das entspricht der gleichen Genauigkeit, die wir bei reinen wäßrigen Cardiazollösungen ohne den Extraktionsgang feststellen konnten.

*Ergebnisse.* Die in Tab. 1 zusammengefaßten Ergebnisse der chemischen Analyse lassen erkennen, daß der Cardiazolgehalt in Blut und Leber in sehr schöner Abhängigkeit von der injizierten Dosis steht. Aus den Einstundenwerten ergibt sich, daß nach dieser Zeit rund 90% der injizierten Cardiazoldosen die Blutbahn verlassen haben. Die Leberwerte liegen um diese Zeit rund 40% niedriger als die Blutwerte, ein Unterschied, der nach der höheren Cardiazoldosis auch in den folgenden 5 Std meist bestehen bleibt. Nach der kleineren Cardiazoldosis sinken in der zweiten Stunde die Blut- und Leberwerte unter 1 mg-%. Merkwürdigerweise war bei der hohen Cardiazoldosis in den folgenden Stunden keine Elimination festzustellen. Vielleicht liegt hier eine Gewebsschädigung durch übermäßig hohe Cardiazolgaben vor, durch die sich das Cardiazol seine eignen Abbauwege blockiert.

Diese Ergebnisse der chemischen Analyse stimmen bei allen 3 Narkosearten praktisch überein. Insbesondere war eine spezifische Hemmung des Cardiazolabbaues durch Avertin nicht festzustellen.

Tatum und Kozelka fanden bei Kaninchen nach intravenöser Injektion von 125 mg/kg Cardiazol bei Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff noch nach 3 Stunden die gleichen Cardiazolwerte in Blut, Leber und Muskeln wie nach 10 min, während bei den Normaltieren diese Werte erheblich abgefallen waren. Dementsprechend hätte sich eine Störung des

Tabelle 1. *Cardiazolgehalt (Milligramm-Prozent) von Blut und Leber in Avertin-, Evipan- und Urethannarkose zu verschiedenen Zeiten nach intravenöser Cardiazolinjektion (mit Angabe der einfachen mittleren quadratischen Abweichung). Tiergewichte 130—260 g.*

| Cardiazol mg/kg i.v. | Narkose Zeit (Stunden) | Avertin n | Avertin Blut mg-% | Avertin Leber mg-% | Evipan n | Evipan Blut mg-% | Evipan Leber mg-% | Urethan n | Urethan Blut mg-% | Urethan Leber mg-% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 250 | 1 | 10 | $32{,}3 \pm 12{,}2$ | $17{,}7 \pm 7{,}5$ | 10 | $32{,}1 \pm 14{,}8$ | $18{,}8 \pm 7{,}9$ | — | — | — |
| | 2 | 7 | $43{,}1 \pm 17{,}8$ | $17{,}7 \pm 5{,}7$ | 6 | $33{,}7 \pm 14{,}3$ | $18{,}4 \pm 4{,}3$ | — | — | — |
| | 3 | 4 | $44{,}1 \pm 18{,}9$ | $20.2 \pm 10{,}7$ | 3 | $21{,}9 \pm 5{,}8$ | $10{,}5 \pm 1{,}4$ | — | — | — |
| | 6 | 3 | $18{,}6 \pm 4{,}5$ | $19{,}4 \pm 14{,}0$ | 3 | $39{,}8 \pm 12{,}5$ | $21{,}1 \pm 7{,}7$ | — | — | — |
| 100 | 1 | 10 | $14{,}3 \pm 4{,}5$ | $8{,}2 \pm 2{,}0$ | 10 | $12{,}0 \pm 4{,}0$ | $6{,}9 \pm 1{,}4$ | 10 | $11{,}7 \pm 2{,}9$ | $7{,}9 \pm 2{,}1$ |
| | 2 | 2 | $< 1$ | $< 1$ | 2 | $< 1$ | $< 1$ | 2 | $< 1$ | $< 1$ |

Cardiazolabbaus durch Avertin wenigstens in unseren Versuchen mit 100 mg/kg Cardiazol bemerkbar machen müssen.

Krämpfe traten in diesen Versuchen nur nach der hohen Cardiazoldosis auf. Die Tiere erwachten aus der Avertinnarkose erst in der zweiten Stunde nach der Cardiazolinjektion, fielen aber dann sofort in einen schweren Krampfzustand, der bei 5 von 7 Tieren nach 2 Std tödlich endete (in der Tab. 1 bei den 2 Std-Werten mit berücksichtigt). Für die Analyse nach 3 und 6 Std waren daher Nachinjektionen von 150 bis 300 mg/kg resp. 450—600 mg/kg Avertin nötig.

Die Evipannarkose war absichtlich flacher gehalten, da wir feststellen wollten, ob bei ähnlich frühem Erwachen wie aus der Avertinnarkose sich auch hier Spätkrämpfe entwickeln könnten. Die Tiere erwachten hier unter der Wirkung des Cardiazol sogar schneller, meist sofort, gerieten jedoch nur ganz allmählich in einen Krampfzustand, der erst nach 3 Std alle Tiere erfaßte und zur Vermeidung von vorzeitigen Todesfällen Nachinjektionen von Evipan (50—400 mg/kg) nur für die nach 6 Std zu analysierenden Tiere nötig machte.

Der mildere Ablauf der nach Evipan aufgetretenen Spätkrämpfe kann angesichts des gleichartigen Verhaltens des Cardiazolspiegels im Körper dieser Tiere seine Ursache nur in einem unterschiedlichen Narkoseablauf haben, d. h. in einem viel langsameren Abklingen der letzten krampfdämpfenden Nachwirkungen des Evipan.

## II. Biologische Versuche über den Einfluß von Avertin auf die Cardiazoltoxicität bei Ratten.

Gros und Haas sahen den Beweis für eine hemmende Wirkung des Avertin auf den Cardiazolabbau in einer Beobachtung, die tatsächlich für eine komplette Hemmung zu sprechen scheint. Sie konnten bei Ratten die Wirkung einer nur wenig über der LD 50 (100 mg/kg) liegenden subcutanen Cardiazoldosis (150 mg/kg) durch Verlängerung der Avertinnarkose mittels Nachinjektionen „beliebig lange" und nur „aus praktischen Gründen" bis auf 15 Stunden ohne Aufhebung des letalen Effektes ausdehnen.

Wir fanden jedoch bei einer Wiederholung dieser Versuche unter zeitlich abgestufter Anordnung eine deutliche Cardiazolentgiftung während der verlängerten Avertinnarkose (Tab. 2). Beispielsweise erreichten wir eine Senkung der Letalität von 100% auf 55%, wenn im Verlauf von 280 min 4 mal 250 mg/kg Avertin gegeben und der Krampfbeginn hierdurch von 100 min auf $7^1/_2$ Std hinausgeschoben war. Durch Erhöhung der Zahl der Injektionen auf 5—8 in einem Intervall von $8^1/_2$—11 Std sank die Letalität auf Null.

Gros und Haas gaben in 15 Stunden bis 1300 mg/kg Avertin, wir selbst in 3—4½ Stunden 750—1000 mg/kg und in 8½—11 Stunden 1250—2000 mg/kg. Die Abweichung der Ergebnisse kann also nicht auf einer zu geringen Avertindosierung in unseren Versuchen beruhen.

Die genannten Autoren haben mit den Avertinnachdosen jeweils bis zum Auftreten von Krämpfen gewartet. Die in Spalte 4 und 6 der Tabelle 2 aufgeführten Versuche wurden von uns in derselben Weise durchgeführt. In den anderen war die Injektionsfolge dichter, wobei Krämpfe in den Intervallen unterblieben. Interessanterweise mußten wir feststellen, daß bei dem ersteren, dem Vorgehen der Autoren mehr angepaßten Verfahren die Letalitätssenkung größer war.

Tabelle 2. *Wirkung wiederholter subcutaner Avertingaben auf die Toxicität von Cardiazol (150 mg/kg subcutan 10 min nach der 1. Avertingabe) bei Ratten. Cardiazollösung 1,5% ig. Tiergewichte 130—300 g.*

| Nr. | Avertin-dosen mg/kg | Zahl der Avertin-injekt. | Zeit zwischen erster u. letzter Avertingabe | Tierzahl | Davon tot | | Krampfbeginn durchschnittl. nach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Zahl | % | |
| 1 | 250 | 1 | — | 12 | 12 | 100 | 101 min |
| 2 | 500 | 1 | — | 10 | 9 | 90 | 257 min |
| 3 | 250 | 3 | 174 min | 13 | 12 | 92 | 357 min |
| 4 | 250 | 3 | 274 min | 8 | 0 | 0 | 433 min |
| 5 | 250 | 4 | 280 min | 11 | 6 | 55 | 445 min |
| 6 | 250 | 5—8 | 515—653 min | 3 | 0 | 0 | 857 min (einmal) |

Tabelle 3. *Wirkung von Avertin und Evipan, einzeln oder kombiniert, auf die Cardiazoltoxicität bei der Ratte. 150 mg/kg Cardiazol subcutan 10 min nach Avertin-, Evipan- oder gleichzeitiger Evipan-Avertininjektion. Tiergewichte 170—300 g.*

| Nr. | Avertin mg/kg | Evipan mg/kg | Avertin 2 mal nachinjiziert innerhalb | Tierzahl | Davon tot | | Krampfbeginn durchschnittl. nach | Tod durchschnittl. nach |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | n | % | | |
| 1 | 250 | — | — | 12 | 12 | 100 | 101 min | 167 min |
| 2 | — | 20 | — | 15 | 6 | 40 | 98 min | 140 min |
| 3 | 250 | — | 174 min | 13 | 12 | 92 | 357 min | 380 min |
| 4 | 250 | 20 | 174 min | 16 | 7 (+1) | 44 (50) | 483 min | 511 min (1 mal 36 Std) |
| 5 | — | 30 | — | 5 | 2 | 40 | 154 min | 100—139 min |
| 6 | 250 | 30 | — | 6 | 3 | 50 | 218 min | 135—260 min |
| 7 | — | 40 | — | 17 | 4 | 24 | 131 min | 166 min |
| 8 | 250 | 40 | — | 18 | 8 (+2) | 44 (56) | 217 min | 220 min (2 mal 24—36 Std) |

Jedoch könnte die Cardiazolentgiftung unter Avertin noch immer verzögert sein, zumal die ermittelte Geschwindigkeit durchaus klein erscheint. Die Beobachtung, daß bei dichterer Folge der Avertinnachdosen die Letalität weniger sank, kann als indirekter Hinweis auf eine Verzögerung der Cardiazolentgiftung dienen, da sich darin eine Abhängigkeit derselben von der im Körper vorhandenen Avertinkonzentration sehen läßt. Vergleichsweise ergaben Versuche mit kleinen (subnarkotischen)

Evipandosen (20—40 mg/kg) eine deutlich stärkere Beeinflussung der Cardiazolletalität trotz früheren Ausbruchs der Krämpfe (98—154 Minuten), wie Tabelle 3 zeigt. Da diese Feststellung aber auch auf die nachhaltigen krampfdämpfenden Evipanwirkungen trotz des vorzeitigen Krampfbeginnes zurückgeführt werden kann, läßt sie den Schluß auf eine raschere Cardiazolentgiftung unter Evipan nicht unbedingt zu.

Die Entscheidung suchten wir zu treffen durch Kombination von Evipan in kleinen Dosen mit narkotischen Avertindosen, die die letale Cardiazolwirkung trotz späteren Krampfbeginnes nicht oder nicht wesentlich beeinflußten. Wir erwarteten dabei im Falle einer Hemmung des Cardiazolabbaues durch Avertin eine Aufhebung der Schutzwirkung des Evipan. Diese trat aber nicht ein (Tab. 3). Nur eine gewisse Steigerung der Letalität ist namentlich in der letzten Spalte der Tabelle festzustellen. Wir deuten die Befunde bei der Evipan-Avertinkombination im wesentlichen als Ergebnis einer über die Avertinnarkose hinausreichenden Schutzwirkung des Evipan, halten aber eine schwache Hemmung der Cardiazolentgiftung durch die aufgepfropfte Avertinnarkose für möglich.

### III. Versuche über die Cardiazolelimination bei Meerschweinchen.

Eine auffallend langsame, auf über 10 Std sich erstreckende Abnahme der Cardiazolwirkung nach subcutaner Injektion von 150 mg/kg fanden Carlsson u. Theander bei Meerschweinchen in Veronalnarkose. Diese Beobachtung spricht dafür, daß sich die Cardiazolelimination nicht nur unter Avertin, sondern auch unter anderen Bedingungen, wenn nicht sogar grundsätzlich relativ langsam vollzieht. Werner u. Tatum sowie Tatum u. Kozelka haben darauf hingewiesen, daß die zuerst von Hildebrandt u. Mügge bestimmte, verhältnismäßig hohe Entgiftungsgröße (0,85 mg/kg/min) bei langsameren Infusionsgeschwindigkeiten infolge einer Abhängigkeit von der Cardiazolkonzentration im Körper geringer ausfallen muß. Nach einmaliger rascher intravenöser Injektion nimmt die Cardiazolentgiftung parallel mit dem sinkenden Gewebsspiegel ab. Bei Kaninchen sahen Tatum u. Kozelka nach Injektion von 50 mg/kg Cardiazol durch laufende Bestimmung des Cardiazolspiegels die Entgiftungsgröße im Verlauf von 4 Std von 0,86 auf 0,08 mg/kg/min absinken. Wir haben diese Versuche durch Bestimmung der letalen Cardiazoldosen am Meerschweinchen mittels Dauerinfusion bei wechselnder Geschwindigkeit ergänzt.

Die Infusionen erfolgten nicht bis zum Eintritt des Todes, sondern wurden bei einem vorher festgesetzten Endwert abgebrochen. Sodann wurde das weitere Schicksal der überlebenden Tiere festgestellt (im folgenden als „zeitlose Methode" bezeichnet). Die infundierten Gesamtmengen betrugen 50, 60, 70, 80, 90, 110 mg/kg. Die Infusionsgeschwindigkeiten betrugen 100, 50 und 25 mg/kg/Std. Die Versuche wurden an Gruppen von je 5 Meerschweinchen durchgeführt. Dabei wurden für jede Infusionsgeschwindigkeit diejenigen Cardiazolmengen ermittelt, die für mehr als

50% und für weniger als 50% letal waren. Den sich daraus ergebenden Zwischenwert setzten wir als mittlere letale Dosis für eine bestimmte Infusionsgeschwindigkeit fest. Hierzu kamen noch an Gruppen von je 5 Tieren Versuche mit rascher intravenöser Cardiazolinjektion (in 15 sec). Wir fanden auf diese Weise folgende tödliche Dosen: Bei rascher Injektion: 45 mg/kg. Nach Infusion von 100 mg/kg/Std: 65 mg/kg, nach 50 mg/kg/Std: 85 mg/kg und nach 25 mg/kg/Std: 95 mg/kg.

Hieraus ergeben sich in Abhängigkeit von der Infusionsgeschwindigkeit Entgiftungsgrößen von 0,51—0,22 mg/kg/min. Sie liegen in der Größenordnung der von Tatum u. Kozelka ermittelten Werte. Eine Übertragung dieser Befunde auf die Verhältnisse bei der subcutanen Resorption scheitert an einer mangelhaften Kenntnis des Resorptionsablaufs. Wahrscheinlich aber klingt die anfänglich schnelle Cardiazolresorption nur allmählich ab und hält so durch eine Art Steuerung der Entgiftungsgröße den Gewebsspiegel über längere Zeit hoch. Wenn man berücksichtigt, daß Tatum u. Kozelka nach rascher Injektion von 50 mg/kg Cardiazol noch nach 4 Std Spuren im Körper fanden, so ist es durchaus nicht unwahrscheinlich, daß bei der langsameren subcutanen Resorption größerer Mengen, wie z. B. 150 mg/kg, wirksame Mengen noch nach einer größeren Zahl von Stunden angetroffen werden.

Alle Erörterungen über den Einfluß von Avertin auf den Cardiazolschwund scheitern letzten Endes an unseren ungenügenden Kenntnissen über das Schicksal von Cardiazol im Körper. Die Bedeutung der Leber ist ebenso angegriffen worden wie eine mögliche Beteiligung der Niere an der Cardiazolentgiftung (Literatur bei Hildebrandt; Biehler). Eine Elimination durch die Niere würde natürlich den von uns nachgewiesenen Cardiazolschwund in Avertinnarkose auch dann verständlich machen, wenn eine Hemmung des Abbaues in der Leber stattfände. Darum haben wir diese Frage erneut geprüft. Wir griffen dabei die Befunde von Fournier u. Selye auf, welche bei nephrektomierten (wie auch bei hepatektomierten) Tieren keine Steigerung der Cardiazolempfindlichkeit sahen. Dieser auch von uns weiter unten bestätigte Sachverhalt schließt aber die Niere als Ausscheidungsfaktor nicht aus, weil sich bei langsamerer Elimination der Ausfall der Niere erst bei der Bestimmung der Eliminationsgröße durch langsame Infusionen bemerkbar machen könnte. Solche Versuche führten wir in folgender Weise aus.

An Meerschweinchen in Äthernarkose wurden nach einem medianen Bauchschnitt die Nierenstiele beiderseits unterbunden. Nach Unterbrechung der Ätherzufuhr wurde eine Dauerinfusion von Cardiazol angeschlossen. Die Kontrolltiere ohne Nierenausschaltung erhielten vor der Infusion eine gleichlange Ätherbeatmung. Die Dauerinfusion ging mit abgestuften Geschwindigkeiten bis zum Tode der Tiere. Aus der infundierten Menge wurde die letale Dosis errechnet. Vergleichsweise wurden an intakten Tieren auch Dauerinfusionsversuche ohne Äthernarkose nach Einbindung der Kanüle in die V. Jugularis unter örtlicher Betäubung mit Novocain durchgeführt.

Der anfängliche Abfall der letalen Dosen mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit (Abb. 1) hängt nach den Befunden bei Lokalanaesthesie einerseits mit der abklingenden Äthernarkose, andererseits mit der Abnahme eines Übertitrationseffektes zusammen. Die Übertitration fehlt bei der oben angegebenen „zeitlosen" Methode, deren Werte, in Abb. 1 eingetragen, sich dem letzten Kurvenstück der intakten Kontrolltiere in Äthernarkose anpassen. Somit ist hier, d. h. von 50 mg/kg/Std abwärts, die Wirkung des Äthers und der Übertitration ausgeschaltet. An dem Ansteigen dieses Kurvenstückes wird zugleich die Elimination sichtbar. Bei den nierenlosen Tieren fällt im gleichen Abschnitt die Kurve in einem

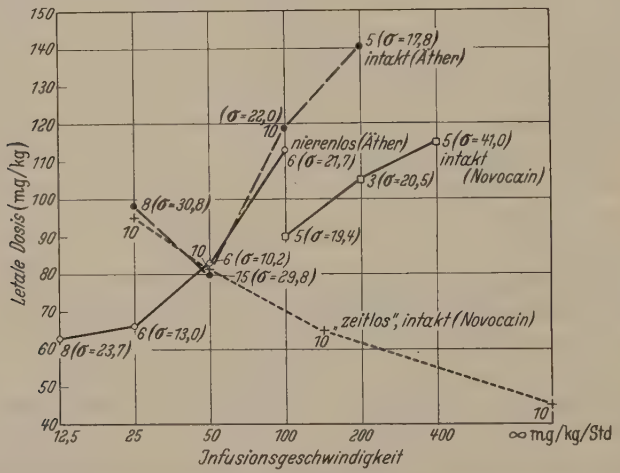



Abb. 1. Mittlere letale Cardiazoldosen nach Dauerinfusion (∞: rasche intravenöse Injektion) bei intakten und nierenlosen Meerschweinchen in Äthernarkose oder Lokalanaesthesie (Novocain), Dauerinfusion bis zum Tode oder bis zu vorher festgelegter Dosis („zeitlos"). Die Zahlen bedeuten die Anzahl der Versuchstiere. Tiergewichte 150—300 g. σ einfache mittlere quadratische Abweichung.

allmählich flacher werdenden Verlauf weiter ab, so daß sich in der Tat durch die Nierenausschaltung eine Hemmung der Cardiazolentgiftung ergibt.

Eine Vortäuschung zu kleiner Werte durch ein spontanes Absterben der Tiere nach der Nierenausschaltung im Verlauf der sehr langsamen Infusionen suchten wir durch Kontrollversuche auszuschließen. Die Infusion war auch bei der langsamsten Geschwindigkeit bis zum Tode im Mittel nach 5 Std abgeschlossen. Dagegen überlebten nierenlose Tiere ohne Cardiazol 3 mal eine mehr als 14stündige Beobachtungszeit und starben erst am folgenden Tage. Nur ein Tier starb nach 7½ Std.

Auch eine etwaige unspezifische, d. h. durch das Operationstrauma bedingte Erhöhung der Cardiazolempfindlichkeit während der Versuchszeit suchten wir auszuschließen. Wegen der beschränkten Lebensdauer war es nicht möglich, die letalen Dosen zeitlos zu messen. Wir haben daher die Absterbezeiten nach Cardiazolinjektionen bestimmt und nur die innerhalb 2 Std eintretenden Todesfälle als cardiazolbedingt angesehen. Diese Todeszeit wird nach intravenösen letalen Cardiazolgaben bei normalen Tieren nur selten überschritten. Das Cardiazol wurde bei den

nierenlosen Tieren 90 min und 4 Std nach der Nierenunterbindung verabreicht. Innerhalb dieser Zeit kann nach den Erfahrungen mit unseren Infusionsversuchen die Ätherwirkung auf Cardiazol als abgeklungen angesehen werden. Die Cardiazoldosen betrugen 40 und 50 mg/kg intravenös. Sie liegen am normalen Tier beiderseits der mittleren letalen Dosis. Von 5 nierenlosen Tieren starb innerhalb 2 Std 1 nach 40 mg/kg Cardiazol und von 4 Tieren 3 nach 50 mg/kg Cardiazol, 90 min nach der Nierenunterbindung verabreicht; ferner von 4 Tieren 2 nach 40 mg/kg Cardiazol, 4 Stunden nach der Operation gegeben. Zum Vergleich wurden auch Tiere herangezogen, bei denen der gleiche operative Eingriff ohne Nierenunterbindung durchgeführt wurde. Diese Tiere zeigten praktisch das gleiche Verhalten. Nach 40 mg/kg Cardiazol, 90 min nach der Operation verabreicht, starb von 4 Tieren 1 in 2 Std; nach 50 mg/kg 5 von 8. In allen Versuchen erreichten die nicht akut gestorbenen Tiere in der Mehrzahl Überlebenszeiten von mindestens 8 Std.

Durch die operativen Eingriffe hat also die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber rasch zugeführtem Cardiazol sicher nicht wesentlich zugenommen. Eine Senkung der akut letalen Dosis um 10 bis 20%, die die eben angeführten Versuche nicht ausschließen können, würde nicht ausreichen, um die in den Infusionsversuchen zwischen intakten und nierenlosen Tieren gefundenen Unterschiede bei den langsamsten Infusionsgeschwindigkeiten zu erklären, d. h. wir müssen die erst bei langsamen Infusionen sichtbar werdende relative Zunahme der Empfindlichkeit nierenloser Tiere als Ausdruck des Wegfalls der Nierenelimination ansehen.

Etwas weniger gut eignete sich ein entsprechendes Vorgehen, um die Bedeutung der Leber für die Cardiazolentgiftung zu messen, weil die Überlebenszeiten (130—235, im Mittel 199 min in 8 Versuchen) der leberlosen Tiere für langdauernde Infusionsversuche zu kurz waren. Die Ausschaltung der Leber erfolgte nach einem von Giertz, Hahn u. Schunk an Meerschweinchen beschriebenen Verfahren in Äthernarkose. Außerdem wurden auch in Urethan- und Avertinnarkose die gleichen Operationen durchgeführt. In allen Fällen wurde die Infusion sofort der Operation angeschlossen. Bei der Betrachtung der in Tab. 4 niedergelegten Werte halten wir es wegen der starken Verkleinerung des Kreislaufs durch die Leberausschaltung für notwendig, die Ergebnisse an den intakten Tieren mit den Ergebnissen an den leberlosen Tieren bei jeweils halber Infusionsgeschwindigkeit zu vergleichen. Dann wird die starke Bindung des Cardiazol an die Leber durch die Verkleinerung der letalen Dosen nach Leberausschaltung sichtbar.

Auch hier ließ sich bei rascher Cardiazolinjektion keine sichere Empfindlichkeitssteigerung der leberlosen Tiere gegenüber Cardiazol nachweisen. Wir injizierten bei 8 in Äthernarkose operierten Tieren 90 min später 30 mg/kg Cardiazol intravenös und fanden als Überlebenszeit 30—190, im Mittel 103 min, d. h. zuzüglich der seit der Operation bis zur Cardiazolinjektion verstrichenen Frist 193 min, also praktisch den gleichen Wert wie ohne Cardiazolinjektion. Erst nach 40 mg/kg, das sind rund 90% der LD 50 am normalen Tier, sanken die Überlebenszeiten auf 15—130, im Mittel auf 65 min, d. h. auf 155 min von der Operation an gerechnet, bei ebenfalls 8 Tieren.

Eine Zunahme der Leberbindung mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit als Ausdruck einer Elimination ist an den Äthertieren nicht festzustellen. Hier fehlen leider die nicht durchführbaren Versuche bei

Tabelle 4. *Letale Cardiazoldosen (Milligramm-Kilogramm) bei intakten und leberlosen Meerschweinchen nach Dauerinfusion bis zum Tode (mit Angabe der einfachen mittleren quadratischen Abweichung). Tiergewichte 160—450 g. Operationsbeginn 20 min nach Avertin, bzw. 50 min nach Urethan. Operationsdauer 7—10 min.*

| Narkose | Infusionsgeschwindigkeit (mg/kg/Std) | 400 | | 200 | | 100 | | 50 | | 25 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | Dos. let. | n | Dos. let. | n | Dos. let. | n | Dos. let. | n | Dos. let. |
| Avertin (250 mg/kg subcutan) | intakt | 5 | *519* ± 105,0 | 5 | *392* ± 132,7 | — | — | — | — | — | — |
| | leberlos | — | — | 5 | *803* ± 234,7 | — | — | — | — | — | — |
| Urethan (1,75 g/kg subcutan) | intakt | 10 | *330* ± 82,3 | 5 | *314* ± 101,0 | 10 | *260* ± 20,1 | — | — | — | — |
| | leberlos | — | — | 10 | *309* ± 117,0 | 5 | *233* ± 17,9 | 10 | *137* ± 32,9 | — | — |
| Äther | intakt | 10 | *233* ± 45,4 | 5 | *141* ± 17,8 | 10 | *119* ± 22,0 | 15 | *85* ± 29,8 | 8 | *98* ± 30,8 |
| | leberlos | — | — | 10 | *152* ± 47,0 | 5 | *112* ± 18,6 | 10 | *75* ± 12,4 | 10 | *58* ± 17,0 |

langsamer Infusion. Eine Zunahme der Bindung ist aber in Urethannarkose vorhanden.

Das Ergebnis in Urethannarkose fiel wohl deshalb günstiger aus, weil diese Narkose im Vergleich zur Äthernarkose relativ konstant ist. Man kann leicht verstehen, daß das Erwachen aus der Äthernarkose die Ergebnisse bei den rascheren Infusionen stört. Weil vergleichbare leberlose Tiere eine langsamere Infusion benötigen, so muß es, wenn die letale Dosis mehr als die Hälfte wie am intakten Tier beträgt, länger als am intakten Tier dauern, bis der tödliche Effekt erreicht ist. Da die Tiere durch das weiter fortschreitende Erwachen aus der Narkose inzwischen aber empfindlicher werden, fällt die letale Dosis niedriger aus, als es bei einer Narkosetiefe der Fall wäre, die der Narkose am intakten Tier im Moment des Todes entsprechen würde.

Interessant ist die Beobachtung, daß bei Avertinnarkose nach Leberausschaltung die tödliche Cardiazoldosis sogar ansteigt. Dies kann nur der Ausdruck der durch die Leberausschaltung gehemmten Avertinzerstörung sein.

## Besprechung der Ergebnisse.

Wenn man sich auf den Standpunkt stellt, daß sowohl Leber als auch Niere an der Cardiazolelimination beteiligt sind, so erscheint eine Verlangsamung der Cardiazolentgiftung durch leberschädigende Stoffe denkbar, ohne daß es zu

einer vollständigen Hemmung kommt. Vielleicht hängt das jeweilige Ergebnis noch von besonderen Versuchsbedingungen ab, namentlich der Dosierung, da es möglich ist, daß je nach der Höhe des Blutspiegels der eine oder der andere Ausscheidungsweg bevorzugt wird. In unseren Versuchen mit Avertin könnte es daher auch von Bedeutung sein, daß das Cardiazol bei den chemischen Untersuchungen intravenös, bei den biologischen subcutan verabreicht worden ist. Wenn nun im letzteren Falle besonders unter dem Einfluß einer verlängerten Avertinnarkose zwar eine vollständige Blockade, aber nicht eine gewisse Verzögerung der Cardiazolentgiftung ausgeschlossen werden kann, so bleibt doch die Frage der Spezifität dieses Vorganges offen. Nimmt man z. B. an, daß auch in den Versuchen von Carlsson u. Theander die lange Nachwirkung des Cardiazol in Veronalnarkose eine Narkosefolge war, so kommen unspezifische narkotische Störungen des Gewebsstoffwechsels, Temperaturschwankungen oder Zirkulationsstörungen in den Ausscheidungsorganen in Betracht. Auch an postnarkotische Empfindlichkeitssteigerungen gegen Cardiazol muß man bei verspäteten Krämpfen denken. Durch die kombinierte Wirkung von Avertin und überhohen Cardiazoldosen könnten schließlich auch Spätschäden zustande kommen, die noch nach langer Zeit zum Tode führen. Auf eine solche Möglichkeit deuten 3 Befunde von tödlichem Ausgang nach 24—36 Std in Tab. 3. Wir glauben hier nicht an einen Zufall, weil Lendle mit einem anderen Analepticum, nämlich Coramin, 24—48 Std nach einer Avertinnarkose tödliche Nachwirkungen erhielt.

Diese Beobachtung von Lendle weist ferner darauf hin, daß das Phänomen der Spätkrämpfe nach Avertin auch nicht spezifisch für Cardiazol zu sein scheint. Befunde mit noch anderen Krampfgiften wären hier von großem Interesse, da nicht angenommen werden kann, daß die Entgiftung chemisch so differenter Stoffe auf dem gleichen avertinempfindlichen Mechanismus beruht.

Die Erwägungen über die Möglichkeit einer Verzögerung des Cardiazolabbaues betreffen weniger die einmalige Avertingabe, bei der die längere Wirkungsdauer des Cardiazol der entscheidende Faktor für den Spätkrampf ist. Gros u. Haas haben selbst nachgewiesen, daß eine Verkürzung der Cardiazolwirkung durch Verkleinerung der Dosen eine Schutzwirkung von Avertin möglich macht. Da grundsätzlich auch mit hinlänglich kleinen Dosen des Kurznarkoticums Evipan verspätete Cardiazolkrämpfe erhalten werden können, so erscheint die Spezifität eines solchen Vorganges für Avertin hier sicher nicht gegeben. Das Chloralhydrat scheidet aus der Betrachtung aus, weil bei ihm eine ähnliche Leberwirkung wie beim Avertin denkbar ist, da beide einer Glucuronsäurepaarung unterliegen.

Unsere Befunde, die im ganzen gesehen einem Einfluß des Avertin auf den Cardiazolabbau nur eine untergeordnete Bedeutung zusprechen,

machen es schließlich nötig, den Cardiazolschwund im Körper als einen Vorgang anzusehen, der auch schon unter normalen Bedingungen langsamer abläuft als ursprünglich angenommen wurde.

## Zusammenfassung.

1. Nach der chemischen Methode von Dister wurde der Cardiazolgehalt in Blut und Leber bei Ratten nach intravenöser Cardiazolzufuhr bestimmt. Es ließ sich zwischen Tieren in Avertin-, Evipan- und Urethannarkose kein Unterschied im Cardiazolschwund nachweisen.

2. Durch Verlängerung der Avertinnarkose bei Ratten mittels Nachinjektionen von Avertin konnte an Hand der Letalität ein kontinuierlicher Abbau subcutaner Cardiazolgaben während der Narkose festgestellt werden, der nach sicher tödlichen Gaben etwa nach 10—12 Std zu subletalen Mengen im Körper führte.

3. Die höhere Schutzwirkung des Evipan im Vergleich zu Avertin hängt mit einer längeren Nachwirkung des Evipan zusammen. Auch subnarkotische Evipangaben zeigen nach dem Abklingen einer aufgepfropften Avertinnarkose noch einen Wirkungsrest auf eine kurz nach Beginn der Avertinnarkose gegebene Cardiazoldosis.

4. Die Cardiazolentgiftung erwies sich am Meerschweinchen als abhängig von der Infusionsgeschwindigkeit. Durch Ausschaltung der Niere und der Leber konnten für die Beteiligung beider Organe an der Cardiazolelimination Beweise erbracht werden.

5. Hinweise auf eine gewisse Verzögerung der Cardiazolentgiftung durch Avertin wurden gefunden. Die Frage der Spezifität dieses Vorganges wird erörtert. Die Hauptursache für das Auftreten von Spätkrämpfen namentlich nach einmaligen Avertingaben liegt jedoch in dem rascheren Schwund der Avertinwirkung.

## Literatur.

Adam, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **113**, 275 (1926). — Arnold, W.: Pharmacie, Paris **5**, 432 (1950). — Biehler, E.: Cardiazolbuch „Knoll" 1951. — Carlsson, A., et G. Theander: Acta pharmac. tox. **2**, 227 (1946). — Dille, J. M., and V. P. Seeberg: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **44**, 624 (1940). — Dister, A.: J. pharmacie Belg. **3**, 255 (1948). — Esser, A., u. A. Kühn: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **21**, 474 (1933). — Fournier, J., and H. Selye: Federat. Proc. **1**, 25 (1942); zit. Cardiazolbuch „Knoll" 1951. — Giertz, H., F. Hahn u. R. Schunk: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 34 (1954). — Gros, O., u. H. T. A. Haas: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 348 (1936). — Hildebrandt, F.: Handb. d. exp. Pharmakol., Erg.-Werk, Bd. **5**, S. 151 (1937). — Hildebrandt, F., u. H. Mügge: Schmerz, Narkose und Anaesthesie **9**, 95 (1936). — Klein, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 422 (1937). — Lendle, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 408 (1936). — Tatum, H. J., and L. L. Kozelka: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **72**, 284 (1941). — Werner and Tatum: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **66**, 260 (1939) Zipf, K., u. H. Mertins: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 702 (1937).

Prof. Dr. F. Hahn, Düsseldorf, Pharmakol. Inst. d. Med. Akademie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 395—402 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. F. Heim).

# Der Einfluß von Megaphen auf Motilität und Sauerstoffverbrauch weißer Mäuse in Ruhe und Erregung*.

Von

Fritz Heim und Bertl Haas.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 2. Juni 1955.)*

Die Wirkung des Megaphens auf den respiratorischen Stoffwechsel und die Wärmeregulation, meist durch gleichzeitige Messung von Sauerstoffverbrauch und Rektaltemperatur bestimmt, wird abhängig von der zur Untersuchung verwendeten Tierart und der Stoffwechselausgangslage, sehr verschieden beurteilt.

Der Einfluß des Megaphens auf die Wärmeregulation scheint bei Menschen und größeren Säugetieren (Hunden) geringer zu sein, als bei kleineren (Meerschweinchen, Ratten, Mäusen). Von Grosse-Brockhoff und Willems wurden beim Menschen, von Irmer, Brendel u. D'Allemand beim Hund unter Megaphen nennenswerte Sauerstoffverbrauchs- und Temperatursenkungen unter die Minimalwerte bei normaler Umgebungstemperatur, von letzteren auch unter Kältebelastung, nicht beobachtet. An Meerschweinchen, Ratten und Mäusen wurden dagegen von Laborit, Labadie, Benitte, Decourt, Courvoisier u. Mitarb. Filk u. Mitarb., Hoffmeister, Vormann u. Weese, Jentzer u. Dubas nach 5—20 mg/kg Megaphen Senkungen des Sauerstoffverbrauches und der Körpertemperatur schon bei normaler, in noch stärkerem Grad bei erniedrigter Umgebungstemperatur beschrieben. Feller beobachtete an Ratten nach 10 mg/kg Megaphen Temperatursenkung, die aber mit einer Sauerstoffverbrauchssteigerung einhergingen. Erst bei Abfall der Körpertemperatur unter 31,5° sank auch der Sauerstoffverbrauch unter den Minimalumsatz ab.

Gegen die Deutung der an Kleintieren beobachteten Senkung des Sauerstoffverbrauchs als echte Stoffwechselwirkung des Megaphens wird von Thauer, Brendel u. D'Allemand eingewandt, daß Megaphen auf Grund seiner sedativ-hypnotischen Eigenschaften erregte Tiere beruhigt und auf diese Weise den Erregungsumsatz auf den Ruheumsatz zu senken vermag, denn wache Kleintiere sind sicher schwer über Stunden unter Ruheumsatzbedingungen zu halten. Die Möglichkeit, eine bei kleinen Versuchstieren zu beobachtende Sauerstoffverbrauchssenkung als Folge sedativ-hypnotischer Megaphenwirkung von einer echten Senkung des Sauerstoffverbrauches unter den Ruheumsatz zu unterscheiden, scheint

* Herrn Prof. Dr. Dr. K. Schübel zum 70. Geburtstag gewidmet.

uns durch die gleichzeitige Messung der Motilität neben Sauerstoffverbrauch und Rektaltemperatur gegeben zu sein. Tritt unter Megaphen eine gleichzeitige Senkung von Sauerstoffverbrauch und Motilität ein, so ist die Umsatzsenkung als Folge einer allgemeinen Beruhigung der Tiere aufzufassen, sinken dagegen Sauerstoffverbrauch und Körpertemperatur ohne Abnahme der Motilität unter die beim unbeeinflußten Tier beobachteten Minimalwerte, so kann daraus auf eine echte Beeinflußung der Wärmeregulation im Sinne einer Steigerung der Wärmeabgabe und Hemmung der Wärmebildung geschlossen werden.

In folgender Arbeit wurden deshalb, nachdem in 10—12 stündiger Versuchsdauer das physiologische tagesperiodische Verhalten von Sauerstoffverbrauch und Motilität an weißen Mäusen und somit auch die Versuchsperiode, in der Sauerstoffverbrauch und Motilität das Tagesminimum aufweisen, bestimmt worden waren, der Einfluß des Megaphen auf Sauerstoffverbrauch, Rektaltemperatur und Atemfrequenz unter gleichzeitiger Registrierung der Motilität untersucht. Weiterhin haben wir den Einfluß des Megaphens auf Motilität und respiratorischen Stoffwechsel erregter Tiere untersucht, wobei die psychische Erregung dadurch zustande kam, daß die Tiere aus der gewohnten in eine ihnen fremde Umgebung gebracht wurden. Andere Formen der Erregung wurden durch subcutane Verabreichung von Pervitin, Morphin, Cocain und Coffein erzeugt.

## Methodik.

Als Versuchstiere wurden 22 männliche Mäuse mit einem Gewicht zwischen 20—34 g verwendet. Die Tiere erhielten Standartkost. Jedes Tier wurde im Abstand von 8—10 Tagen, zu Versuchen bei denen Megaphen zur Anwendung kam, nur in 3—4 wöchentlichen Abständen herangezogen. Gewöhnung an Megaphen, wie sie bei täglicher Verabreichung an Ratten von Courvoisier u. Mitarb., sowie Filk u. Mitarb. beobachtet wurden, trat in unseren Versuchen nicht auf. Zur gleichzeitigen Bestimmung von Motilität und Sauerstoffverbrauch wurden die Tiere für die Versuchsdauer von 10—12 Std in ein exsiccatorähnliches, rundes Glasgefäß von 2,5 l Inhalt gebracht. Um bei der Messung die Laufbewegungen möglichst vollständig zu erfassen, konnten sich die Tiere in dem Stoffwechselgefäß nur in einem entlang der Außenwand führenden 40 cm langen, schmalen Gang bewegen. Im Mittelraum des Gefässes befanden sich zur Absorption des Atmungswassers Calciumchlorid und zur Absorption der Kohlensäure feinkörniger Natronkalk. Wegen des großen Nahrungsbedarfes — der Umsatz der Mäuse pro Gewichtseinheit ist etwa 25 mal größer als der des Menschen — waren im Laufgang Haferkörner und Sonnenblumenkerne, in einer nach unten offenen Ampulle Trinkwasser enthalten. Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels eines Spirometers gemessen und pro Minute und Quadratzentimeter Oberfläche nach der Formel $0 = k\,x\,\sqrt[3]{G^2}$ errechnet, wobei $G$ das Gewicht der Tiere und $k$ ein konstanter Faktor ist, der für die weiße Maus 11,4 beträgt. Das 2,9 kg schwere Stoffwechselgefäß war an seiner Umrandung an 3 in gleichen Abständen voneinander befindlichen Spiralfedern aufgehängt. Die Ausschläge des Gefäßes, die aus den bei den Laufbewegungen der Tiere sich ergebenden Gewichtsverlagerungen resultierten, wurden auf einem Kymographion registriert. Das Meßsystem war durch den

großen Gewichtsunterschied zwischen Versuchstier und Stoffwechselgefäß so stark gedämpft, daß störende Nachschwankungen nicht auftraten. Ein vollständiger Ausschlag entsprach einem halben Umlauf, d. h. einer Bewegung der Tiere um 20 cm in einer Richtung. Als Einheit für die Motilität der Tiere wurde das Produkt aus der Zahl der pro Stunde zurückgelegten Umläufe (1 Umlauf = 40 cm) und der dabei aufgewandten Kraft, gemessen an der Höhe der Ausschläge, gewählt. Für die Höhe der Ausschläge die nur durch das Gewicht der Tiere bedingt war, wurde die Größenordnung 1 gewählt. Nur unter Pervitin und Cocain wurden Ausschlaghöhen beobachtet, die über den lediglich durch das Gewicht der Tiere bedingten lagen. In diesen Fällen wurde der Quotient aus der Ausschlaghöhe unter Pervitin bzw. Cocain und der normalen Ausschlaghöhe errechnet und mit der Anzahl der Umläufe pro Stunde multipliziert. Die Bestimmung der Rektaltemperatur mittels Thermoelement und Saitengalvanometer erfolgte in einer gesonderten Versuchsreihe. Die Raumtemperatur betrug 24,3°. Die Versuche wurden in der Zeit von April bis Dezember durchgeführt. Zu allen Versuchen wurden stets die gleichen Mäuse verwendet, so daß der durch die Auswahl der Tiere entstehende Fehler gering gehalten werden konnte. Unterschiede zwischen zwei vergleichbaren Versuchsreihen wurden in der üblichen Weise statistisch errechnet. In den hier mitgeteilten Versuchen beträgt die Wahrscheinlichkeit des Fehlers der Auswahl wenn $D = 2{,}0$ 5%, $D = 2{,}45$ 2%, $D = 3{,}0$ 1%.

## Ergebnisse.

**Versuche an unbeeinflußten Tieren** (Leerversuche). Das Verhalten von Motilität und Sauerstoffverbrauch eines unbeeinflußten Kollektivs von 16 Tieren während einer von 9—21 Uhr dauernden 12 stündigen Versuchsperiode ist aus Abb. 1, Kurve I zu ersehen. Es zeichnen sich drei Phasen ab, die erste von 9—12 Uhr, die zweite von 12—16 Uhr und die dritte von 16—21 Uhr. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch das Absinken von Motilität, Sauerstoffverbrauch und Atemfrequenz von den Tageshöchstwerten der 1. Versuchsstunde auf die Tagesminima, die in der zweiten Phase von 12—16 Uhr weitgehend konstant bleiben und zwischen 16 und 21 Uhr wieder die für die verwendete Tierart typischen abendlichen Anstiege zeigen, die zwischen 21 und 24 Uhr ihr Maximum erreichen würden. Die von Bänder (2) beobachtete abendliche Atemfrequenzsteigerung kommt in unseren Versuchen deshalb kaum zum Ausdruck, weil die Atemfrequenz nicht während des Umherlaufens gemessen werden konnte. Die hohen Werte der ersten Versuchsstunde resultieren aus der starken Erregung der Tiere, die immer dann auftritt, wenn weiße Mäuse aus ihrer gewohnten Umgebung in eine neue gebracht werden. Die an einem anderen Tag, aber an den gleichen Tieren, über 15 Stunden stündlich gemessene Rektaltemperatur lag im Mittel bei 38,4° und zeigte wahrscheinlich deshalb keine tagesperiodischen Schwankungen wie Sauerstoffverbrauch und Motilität, weil die mit der Messung notwendig verbundenen Manipulationen die Tiere stets in Erregung versetzten. Bänder (2) fand als niedrigsten Tageswert bei weißen Mäusen eine Rektaltemperatur um 35°, die zeitlich mit dem Sauerstoffverbrauchs- und Motilitätsminimum zusammenfiel.

In einer zweiten Versuchsreihe am gleichen Tierkollektiv wurde den Tieren in der 4. Versuchsstunde 0,005 mg/g Körpergewicht Megaphen subcutan gegeben. Der Sauerstoffverbrauch sinkt in der 3.—5. Std nach Verabreichung des Megaphens, wie aus Abb. 1, Kurve II hervorgeht,

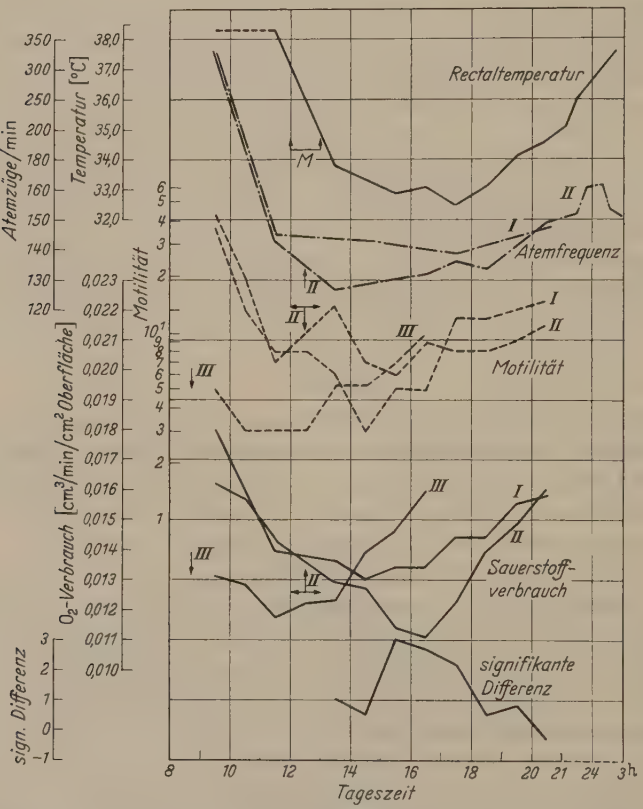



Abb. 1. Mittelwerte der Rectaltemperatur, Atemfrequenz, Motilität und des Sauerstoffverbrauchs von 16 weißen Mäusen. Versuchsreihe I: Leerversuche. Versuchsreihe II: 0,005 mg/g Megaphen s.c. gegeben innerhalb der 4. Versuchsstunde zwischen 12 und 13 Uhr. Versuchsreihe III: 0,005 mg/g Megaphen s. c. gegeben vor Beginn des Versuches zwischen 8 und 9 Uhr. ⟷ Unterbrechung der Messungen. ↑ II: 0,005 mg/g Megaphen in Versuchsreihe II; ↑ III: 0,005 mg/g Megaphen in Versuchsreihe III (Motilität logarithmisch angetragen).

signifikant unter die Werte des Leerversuches ab. Der Grad der Signifikanz ist der in Abb. 1 unten dargestellten Kurve zu entnehmen. Im Gegensatz zum Sauerstoffverbrauch ist die Motilität nach Megaphen gegenüber dem Leerversuch, in dem sie zwischen 3 und 7 Umläufen pro Stunde liegt, auf 6—14 Umläufe pro Stunde angestiegen. Die Atemfrequenz liegt nur in der ersten Stunde nach Megaphen merklich, und zwar um 12% unter den Leerwerten. Die Rektaltemperatur sinkt dagegen von

38,3° vor auf 32,5° 5 Std nach Megaphen ab. Sie erreicht erst 12—15 Std nach der Injektion wieder annähernd die Ausgangswerte. Somit hält der Einfluß des Megaphens auf Motilität und Atemfrequenz am kürzesten, etwa 5 Std, auf den Sauerstoffverbrauch etwa 6 Std und die Körpertemperatur etwa 14 Std an.

Da die in Abb. 1 wiedergegebenen Sauerstoffverbrauchs- und Motilitätswerte die für die jeweilige Versuchsstunde errechneten Mittelwerte darstellen, bei den einzelnen Tieren aber das Sauerstoffverbrauchs- und Motilitätsminimum zu verschiedenen Zeiten des Versuches erreicht wurde,

*Tabelle 1.*

| Mittlerer Minimal-$O_2$-Verbrauch in cm³/min/cm²/Oberfläche | | Mittlere Motilitätswerte Umlauf/Stunde | |
|---|---|---|---|
| Leerversuch | 0,005 mg/g Megaphen | Leerversuch | 0,005 mg/g Megaphen |
| 0,0118 | 0,0101 | 1,4 | 5,6 |
| Senkung 14,4% | | | |
| D 2,23 | | | |

haben wir die Mittel aus den an jedem Tier beobachteten niedrigsten Sauerstoffverbrauchswerten und die dazugehörigen Motilitätszahlen in Tab. 1 dargestellt. Auch bei dieser Form der Auswertung der Versuchsergebnisse ergibt sich eine signifikante Senkung des Sauerstoffverbrauches durch Megaphen, bei gleichzeitiger geringer Motilitätszunahme.

Das durch Megaphen verursachte Absinken des Sauerstoffverbrauches und der Rektaltemperatur unter die Tagesminimalwerte bei unverminderter Motilität veranlaßte uns, an dem von uns verwendeten Mäusekollektiv die Fähigkeit zu gegenregulatorischer Wärmebildung bei Erniedrigung der Umgebungstemperatur zu prüfen, zumal Brendel u. D'Allemand eine geringe Fähigkeit zu gegenregulatorischer Wärmebildung bei Kleintieren vermuten. In einer den in Abb. 1 wiedergegebenen Leerversuchen analogen Versuchsreihe wurde die Umgebungstemperatur statt bei 24,3 auf 20,9° gehalten. Dabei war während 8 Versuchsstunden, von 11—19 Uhr der Sauerstoffverbrauch signifikant um 16,5 % erhöht. Dies bedeutet eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches um 5% pro Temperaturabnahme um 1° C. Die Motilität blieb dabei unbeeinflußt. Zu gleichen Ergebnissen kamen Courvoisier u. Mitarb., sowie Benitte an Ratten und Brendel u. D'Allemand an Hunden. Dieses Versuchsergebnis zeigt, daß auch weiße Mäuse im Stande sind, auf Wärmeverlust mit gegenregulatorischer Sauerstoffverbrauchssteigerung und Wärmebildung zu reagieren, so daß die unter Megaphen beobachtete Senkung der Körpertemperatur und des Sauerstoffverbrauchs unter Tagesminimalwerte als eine spezifische Hemmung der Fähigkeit zu gegenregulatorischer Wärmebildung angesehen werden muß.

**Versuche an erregten Tieren**: Wie bereits beschrieben, befinden sich die Tiere, wenn sie morgens in das Stoffwechselgefäß gebracht werden, im Zustand starker Erregung. Erhalten sie kurz vorher 0,005 mg/g Körpergewicht Megaphen subcutan, dann kann, wie aus Abb. 1, Kurve III hervorgeht, die durch die psychische Erregung hervorgerufene Motilitäts- und Sauerstoffverbrauchssteigerung vollständig ausbleiben.

Zu Hypermotilität und Sauerstoffverbrauchssteigerung führt auch die Vorbehandlung mit Pervitin, Morphin, Cocain und Coffein (Tab. 2). Bei gleichzeitiger Verabreichung von Pervitin und Megaphen bzw. Morphin

*Tabelle 2.*

| | Dosis in mg/g Körpergewicht | Motilitätssteigerung um das -fache während 5 Std. | $O_2$-Verbrauchssteigerung in % während 5 Std. | $O_2$-Verbrauchssteigerung / Motilitätssteigerung $= Q$ | Dauer der $O_2$-Verbrauchs- und Motilitätssteigerung in Stunden | Hemmung der Motilitätssteigerung durch 0,005 mg/g Megaphen | Hemmung der $O_2$-Verbrauchssteigerung durch 0,005 mg/gMegaphen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pervitin | 0,002 | 42 | 46% | 1,1 | 5 | 97% | 100% |
| Morphin | 0,015 | 22 | 26% | 1,2 | 3 | 98% | 100% |
| Cocain | 0,015 | 11 | 24% | 2,2 | 2 | 92% | 64% |
| Coffein | 0,03 | 8 | 47% | 5,9 | 3 | 66% | 55% |
| Spontanerregung | | 2,3 | 14% | 6,0 | 3 | 100% | 100% |

und Megaphen werden die Sauerstoffverbrauchs- und Motilitätssteigerung nahezu vollständig bzw. vollständig aufgehoben. Unter der Einwirkung von Megaphen + Pervititin, bzw. Megaphen + Morphin sinkt, der Sauerstoffverbrauch schneller auf die niedrigsten Werte als unter Megaphen allein. Außerdem führt die Kombination Megaphen + Morphin zu einer um 14,2% stärkeren Senkung des Sauerstoffverbrauchs als Megaphen allein. Ebenso wird die Atemfrequenz durch die Kombination Megaphen + Morphin signifikant unter die an gleichen Tieren unter Megaphen allein gemessenen Werte gesenkt. Auf Grund der von Bänder der (1) für weiße Mäuse aufgestellten Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Atemfrequenz erklärt sich die unter Megaphen + Morphin beobachtete zusätzliche Sauerstoffverbrauchssenkung zu etwa 60% aus der gleichzeitigen Reduktion der Atemfrequenz.

Während Megaphen die durch psychische Erregung, Pervitin und Morphin verursachte Motilitäts- und Sauerstoffverbrauchssteigerung zu 97—100% aufzuheben vermag, ist es gegenüber der durch Cocain und besonders durch Coffein erzeugten Hypermotilität und Sauerstoffverbrauchssteigerung weniger wirksam. In Spalte 3 der Tab. 2 sind die innerhalb von 5 Std nach Verabreichung hervorgerufenen Motilitätssteigerungen in Zahlen angegeben; diese betragen das Vielfache der Ausgangswerte. Spalte 4 ergibt die prozentuale Sauerstoffverbrauchssteigerung während der gleichen Zeit. Spalte 5 enthält den jeweiligen

Quotienten, berechnet aus dem Verhältnis von Sauerstoffverbrauchssteigerung zu Motilitätssteigerung unter Zugrundelegung der in Spalte 3 und 4 wiedergegebenen Zahlen. Aus dem Vergleich dieser Quotienten ergibt sich, daß im Vergleich zu Pervitin und Morphin der respiratorische Stoffwechsel durch Cocain, besonders aber durch Coffein und psychische Erregung stärker angeregt wird als die Motilität. Den Spalten 7 und 8 ist zu entnehmen, daß die durch psychische Erregung, Pervitin und Morphin hervorgerufene Motilitäts- und Sauerstoffverbrauchssteigerung durch Megaphen vollständig, die durch Cocain und Coffein verursachte nur teilweise gehemmt wird. Es ist deshalb anzunehmen, daß beim Zustandekommen der durch Cocain und Coffein ausgelösten Sauerstoffverbrauchszunahme und der unter Coffein zu beobachtenden Motilitätssteigerung Vorgänge nicht zentralnervöser Natur mitbeteiligt sind, die sich dem Einfluß des Megaphens entziehen. Im Gegensatz zu Pervitin und Morphin als Pharmaka mit fast rein zentralem Angriffspunkt, besitzen Cocain als stark wirkendes Sympathicomimeticum und Coffein mit seiner unmittelbarem Wirkung auf Herz und Gefäße, sowie auf Nieren und quergestreifte Muskulatur auch periphere Angriffspunkte. Die Beobachtung, daß Megaphen Motilitäts- und Sauerstoffverbrauchssteigerungen nicht ausschließlich zentralnervöser Genese nur unvollständig aufzuheben vermag, spricht gegen die Annahme einer „histoplegischen", d. h. den allgemeinen Stoffwechsel hemmenden Wirkung dieser Substanz.

## Zusammenfassung.

An weißen Mäusen wurden Motilität und Sauerstoffverbrauch während 10—12 Std und zwar in der Regel von 9 Uhr morgens bis 21 Uhr abends bestimmt. Die anfänglich hohen Motilitäts- und Sauerstoffverbrauchswerte sinken innerhalb 3 Std auf das Tagesminimum ab. Verabfolgt man jetzt 0,005 mg/g Körpergewicht Megaphen, so sinkt der Sauerstoffbedarf weiterhin signifikant ab ohne eine weitere Abnahme der Motilität. Die Körpertemperatur nimmt im Mittel von 38,3 auf 32,5° ab, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß bereits unvorbehandelte Mäuse im Zustand völliger Ruhe eine Rektaltemperatur von nur 35° aufweisen.

0,03 mg/g Körpergewicht Coffein, 0,015 mg/g Cocain, 0,015 mg/g Morphin und 0,002 mg/g Pervitin wirken in der genannten Reihenfolge in zunehmendem Maße motilitätssteigernd. Die gleichzeitige Zunahme des Sauerstoffverbrauchs beträgt bei Pervitin und Coffein 46—47 %, bei Morphin und Cocain 24—26%. Die durch psychische Erregung sowie durch Pervitin und Morphin hervorgerufene Sauerstoffverbrauchszunahme wird durch 0,005 mg/g Megaphen vollständig unterdrückt, die des Cocains und Coffeins dagegen nur teilweise. Die durch Pervitin, Morphin und Cocain verursachte Motilitätssteigerung wird durch Megaphen zu fast 100%, die des Coffeins nur zu 66% gehemmt.

Die Atemfrequenz der Tiere wird nicht durch Megaphen allein, wohl hingegen durch die Kombination Megaphen + Morphin signifikant verändert. Die Abnahme der Atemfrequenz unter Megaphen + Morphin erklärt teilweise die gleichzeitige Abnahme des Sauerstoffverbrauchs unter die durch Megaphen allein bedingten Werte.

## Literatur.

Bänder, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 619—637 (1949); Z. exper. Med. **115**, 229—250 (1950). — Benitte, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 20—41 (1954). — Brendel, W., u. H. D'Allemand: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 87 (1955). — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie XCII Nr. 3—4, 305 (1953). — Decourt, Ph.: Comt. rend. Acad. Sc. URSS **236**, 1195 (1953). — Decourt, Ph., M. Brunaud et S. Brunaud: Comt. rend. Soc. biol. (Paris) **147**, 1605 (1953). — Feller, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 90 (1955). — Filk, H., K. Ritter, E. Stürmer u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1954**, 265—266. — Filk, H., u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1954**, 661. — Grosse-Brockhoff, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 63—67 (1954). — Hoffmeister, Vormann u. H. Weese: Zit. n. Killian, H., u. H. Weese: „Die Narkose". Thieme-Verlag, Stuttgart 1954. — Irmer, W.: Vortrag auf der 70. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München 10. 4. 1953. — Jentzer, A., u. J. Dubas: Journ. Transfusionelles 12./13. Sept. 1953 Genf. — Labadie, P.: Journal de Médecine de Bordeaux **10**, 996—999 (1952). — Laborit, H.: Acta anaesthesiologica Belgica (Bruxelles) **2**, 710 (1951). — Laborit, H.: Revue Path. comp. et Hyg. gen. **644**, 65 (1953); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41—58 (1954). — Laborit, H., u. C. Jaulmes: Toulouse Médical **10**, 821—829 (1952). — Thauer, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 80 (1954). — Willems, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 85 (1954).

Dr. Fritz Heim, Erlangen, Pharmakol. Institut d. Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 403—416 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke).

# Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin.

Von

O. Kraupp, W. Kobinger, H. Stormann und G. Werner.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 25. Mai 1955.)*

In einer vorangegangenen Arbeit[9] wurde gezeigt, daß Acetylcholin (ACh) an der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur von Warmblütern nach intraarteriellen Injektionen eine Kaliumfreisetzung bewirkte, die qualitativ und quantitativ durch Einwirkung von ACh auf die motorische Endplatte im Sinne der „Kurzschlußdepolarisation" von Fatt und Katz[5] befriedigend erklärt werden konnte. Die Dauer der durch ACh als Überträgersubstanz bewirkten Depolarisation der Endplatte wird durch Eserin[3, 4] bedeutend verlängert, während andererseits durch Einwirkung von d-Tubocurarin (dTC)[10] die Höhe des Endplattenpotentials (bzw. der Grad der Endplattendepolarisation) verringert wird; dementsprechend ist nach Eserinvorbehandlung eine Erhöhung, nach dTC hingegen eine Erniedrigung des Gesamtionenstroms durch die Endplatte bei Einwirkung von ACh zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welcher Weise die durch ACh hervorgerufene Kaliumabgabe aus innervierter und denervierter Muskulatur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Eserin bzw. dTC verändert wird.

## Methodik.

Die Durchströmung der hinteren Extremitäten von Katzen erfolgte in derselben Anordnung wie in[9]. An jedem Tier war eine Extremität 8—14 Tage vor dem Durchströmungsversuch durch Durchschneidung der Nn. ischiadicus und femoralis denerviert worden. ACh wurde in Einzelinjektionen (Injektionsvolumen 1 ml) in den Schlauch der Aortenkanüle verabreicht. Eserin und dTC wurden vom Beginn der Durchströmung an in den in den einzelnen Versuchen gewählten Konzentrationen der Durchströmungsflüssigkeit zugesetzt. Das aus dem Tier ausströmende Blut wurde getrennt aus innervierter und denervierter Extremität in Sammelperioden von je 2 min Dauer aufgefangen und der Kaliumgehalt der einzelnen Proben in derselben Weise wie in[9] angegeben, bestimmt.

## Versuchsergebnisse.

*A. Kaliumfreisetzung durch intraarterielle Einzelinjektionen von ACh bei gleichzeitiger Anwesenheit von Eserin in der Durchströmungsflüssigkeit.*

*1. Innervierte Muskulatur.* Die in den Versuchen an der innervierten Muskulatur verwendeten Eserinkonzentrationen sind zusammen mit den ACh-Dosen und den dazugehörigen Werten der Kaliumausschüttung sowie den Durchflußgrößen in Tabelle 1, Spalte 3—6 eingetragen.

Die Werte für die Kaliumfreisetzung wurden in derselben Weise wie in [9] berechnet; hierzu wurden zunächst die Differenzen zwischen den Kaliumkonzentrationen der jeweiligen auf die ACh-Injektion folgenden Sammelperioden und den Konzentrationen der Kontrollperioden vor und nach der Injektion bestimmt; diese Konzentrationsdifferenzen wurden mit den Durchflußvolumina der dazugehörigen Sammelperioden multipliziert und summiert. Bei sämtlichen verwendeten Eserinkonzentrationen war die in den Kontrollperioden vor den ACh-Injektionen auftretende Spontanfreisetzung in der Größe von 2—4 $\mu$M pro min gelegen und unterschied sich damit nicht von der Spontanfreisetzung in analogen Versuchen ohne Eserin[9].

Die in Tab. 1, Spalte 5 angegebenen Werte für die Kaliumausschüttung am innervierten Muskel sind in Abb. 1 in Abhängigkeit von den Logarithmen der verwendeten ACh-Dosen eingezeichnet. Für die Meßpunkte wurde zunächst ohne Berücksichtigung der verwendeten Eserinkonzentrationen nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die folgende lineare Dosis-Wirkungsbeziehung errechnet:

$$y = -25{,}27 + 23{,}26\, x \qquad \text{(I)}$$
$$r = \quad 0{,}69;$$

Die Confidenzintervalle der Steigung $\beta$ sind:

$$10{,}12 < \beta < 33{,}4.$$

($y$ = Kaliumabgabe in $\mu$M; $x$ = log ($10^3 \cdot$ ACh-Dosis in $\mu$M); $r$ = Korrelationskoeffizient; $\beta$ = Steigung der Geraden.)

Von den in Tab. 1 angegebenen 26 Werten für die Kaliumabgabe wurden 18 bei der Eserinkonzentration $10^{-7}$ und 8 bei der Eserinkonzentration $5{,}10^{-5}$ Mol/l gewonnen; da es ohne weiteres ersichtlich war, daß die bei den beiden verschiedenen Eserinkonzentrationen erhaltenen Werte der Kaliumabgabe nicht systematisch voneinander abwichen, wurden alle Meßpunkte (mit Ausnahme der unterhalb des Grenzdosenbereiches liegenden Nullwerte) zur statistischen Berechnung der oben angegebenen Geraden I herangezogen. Ferner wurden nach dem in[9] angegebenen Verfahren die Confidenzintervalle der Mittelwerte der Logarithmen der ACh-Dosen gleicher Kaliumausschüttung bestimmt und in Abb. 1 zugleich mit den entsprechenden Konfidenzbereichen der ACh-Dosen am innervierten und denervierten Muskel ohne Eserinvorbehandlung eingezeichnet; die letzteren Daten wurden aus[9] übernommen.

Aus der Abbildung geht hervor, daß bei niederen ACh-Dosen die Konfidenzbereiche der Dosis-Wirkungsbeziehungen von innerviertem Muskel

*Tabelle 1.*

| Vers.-Nr. | Denerv. Zeit in Tagen | innerviert | | | | denerviert | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ACh-Dosis in $\mu$M | log ACh-Dosis | $K$-Ausschüttung in $\mu$M | Fluß cm³/min | ACh-Dosis in $\mu$M | log ACh-Dosis | $K$-Ausschüttung in $\mu$M | Fluß cm³/min | |
| KK 4 | 9 | 1,15 | 0,060 | 18,2 | 16,2 | 1,23 | 0,089 | 134,8 | 17,5 | $10^{-7}$ Eserin |
| KK 13 | 8 | 0,0095 | 0,977—3 | 0 | 19,5 | 0,008 | 0,903—3 | 0 | 17,3 | $10^{-7}$ Eserin |
| KK 13 | 8 | 0,032 | 0,505—2 | 0 | 19,2 | 0,021 | 0,322—2 | 15,0 | 18,0 | |
| KK 13 | 8 | 0,044 | 0,643—2 | 0 | 25,7 | 0,044 | 0,643—2 | 46,0 | 27,8 | |
| KK 13 | 8 | 0,227 | 0,356—1 | 12,0 | 19,9 | 0,215 | 0,332—1 | 114,0 | 20,4 | |
| KK 13 | 8 | 0,426 | 0,629—1 | 17,0 | 19,2 | 0,455 | 0,658—1 | 136,0 | 19,2 | |
| KK 13 | 8 | 2,28 | 0,357 | 41,0 | 18,6 | 2,14 | 0,330 | 147,0 | 16,6 | |
| KK 14 | 12 | 0,077 | 0,886—2 | 29,0 | 20,6 | 0,101 | 0,004—1 | 156,0 | 26,0 | $10^{-7}$ Eserin |
| KK 14 | 12 | 0,0235 | 0,371—2 | 0 | 23,0 | 0,0235 | 0,371—2 | 40,0 | 23,0 | |
| KK 14 | 12 | 0,85 | 0,929—1 | 109,0 | 22,5 | 0,92 | 0,963—1 | 386,0 | 22,5 | |
| KK 14 | 12 | 5,12 | 0,709 | 89,0 | 25,0 | 3,72 | 0,570 | 299,0 | 18,5 | |
| KK 14 | 12 | 10,0 | 1,000 | 59,0 | 23,5 | 7,1 | 0,851 | 194,0 | 23,0 | |
| KK 14 | 12 | 22,2 | 1,346 | 48,1 | 21,0 | 22,2 | 1,346 | 110,0 | 21,0 | |
| KK 15 | 14 | 0,01 | 0,000—2 | 0 | 25,0 | 0,009 | 0,954—3 | 45,0 | 22,5 | $10^{-7}$ Eserin |
| KK 15 | 14 | 0,025 | 0,397—2 | 0 | 23,0 | 0,023 | 0,361—2 | 188,0 | 22,5 | |
| KK 15 | 14 | 0,043 | 0,633—2 | 0 | 22,8 | 0,044 | 0,643—2 | 198.5 | 20,0 | |
| KK 15 | 14 | 0,945 | 0,975—1 | 33,0 | 19,5 | — | — | — | —* | *Keine Rückkehr zum |
| KK 15 | 14 | 4,45 | 0,648 | 60,0 | 18,8 | — | — | — | —* | Wert der spontanen $K^+$-Abgabe der anfänglichen Kontrollperioden. |
| KK 16 | 12 | 0,0025 | 0,397—3 | 0 | 27,0 | 0,002 | 0,301—3 | 0 | 24,0 | $5 \cdot 10^{-5}$ Eserin |
| KK 16 | 12 | 0,012 | 0,079—2 | 0 | 27,0 | 0,01 | 0,000—2 | 0 | 21,5 | |
| KK 16 | 12 | 0,052 | 0,716—2 | 24,0 | 28,5 | 0,036 | 0,556—2 | 30,0 | 19,7 | |
| KK 16 | 12 | 0,28 | 0,447—1 | 36,0 | 30,0 | 0,166 | 0,220—1 | 90,0 | 15,0 | |
| KK 17 | 14 | 0,011 | 0,041—2 | 0 | 23,2 | 0,011 | 0,041—2 | 77,0 | 23,3 | $5 \cdot 10^{-5}$ Eserin |
| KK 17 | 14 | 0,023 | 0,361—2 | 0 | 22,5 | 0,021 | 0,322—2 | 161,0 | 28,0 | |
| KK 17 | 14 | 0,04 | 0,602—2 | 11,6 | 19,5 | 0,048 | 0,681—2 | 319,0 | 30,0 | |
| KK 17 | 14 | 0,23 | 0,361—1 | 43,0 | 24,5 | 0,21 | 0,322—1 | 275,0 | 27,0 | |
| KK 17 | 14 | — | — | — | — | 4,20 | 0,623 | 240,0 | 27,0 | |

unter Eserineinwirkung und denerviertem Muskel ohne Eserinzusatz zusammenfallen; bei höheren Dosen hingegen findet eine Überschneidung mit dem Konfidenzbereich der Dosis-Wirkungsbeziehung des innervierten Muskels ohne Eserineinwirkung statt. Dementsprechend verstärkt Eserin die kaliumfreisetzende Wirkung von ACh am innervierten Muskel nur bis zu Dosen von etwa 10 $\mu$M in signifikanter Weise. Die Verstärkung der an der Kaliumausschüttung beobachteten ACh-Wirkung durch Eserin tritt am deutlichsten bei den ACh-Grenzdosen in Erscheinung, wo sie das Ausmaß der Empfindlichkeitssteigerung durch Denervierung erreicht (annähernd 100fach).

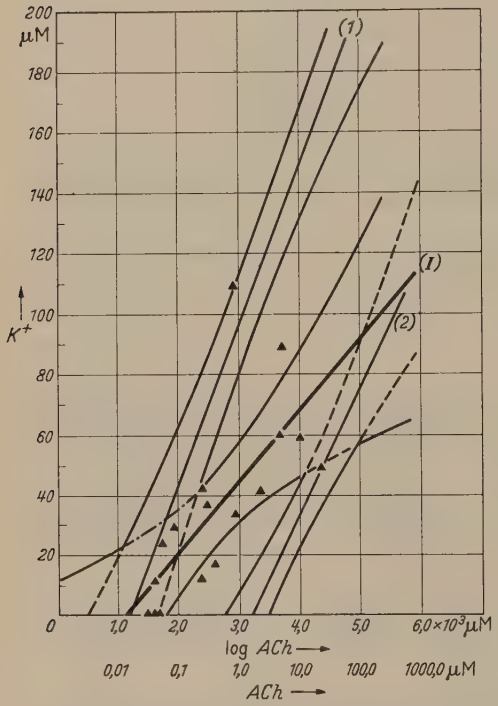



Abb. 1. Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch ACh an der unter Eserineinwirkung stehenden innervierten Skeletmuskulatur der hinteren Extremitäten von Katzen (I). Zum Vergleich sind die Dosis-Wirkungskurven der Kaliumfreisetzung durch ACh an der nichteserinisierten innervierten (2) und denervierten (1) Skeletmuskulatur mit eingezeichnet. Die dünn ausgezogenen Kurven geben die Begrenzung der Konfidenzbereiche der Mittelwerte der Dosenlogarithmen von ACh, die gleicher Kaliumausschüttung zuzuordnen sind, an. Ordinate: $\mu$M Kaliumionen. Abszisse: Logarithmen der ACh-Dosen in $\mu$M. Der Nullpunkt des Abszissenmaßstabes wurde zur Vereinfachung der statistischen Rechnungen bei log ACh $10^{-9}$ Mol angenommen.

*2. Denervierte Muskulatur.* Die kaliumfreisetzende Wirkung von ACh auf den unter Eserinwirkung stehenden Skeletmuskel ist aus den Werten der Tabelle 1, Spalte 7—10 zu ersehen. Ebenso wie am innervierten Muskel führte der Eserinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit bis zu einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l zu keiner nennenswerten Steigerung der spontanen Kaliumabgabe in den Leerperioden; allerdings kam es in einem Versuch nach der dritten ACh-Injektion zu einer persistierenden verstärkten Abgabe von Kaliumionen an die Durchströmungsflüssigkeit: demzufolge konnte in diesem Falle kein Wert für die effektiv durch die ACh-Dosis freigesetzte Kaliummenge errechnet werden.

Die graphische Darstellung der bei allen übrigen Injektionen von ACh bestimmten Freisetzung von Kaliumionen in Abhängigkeit von den Dosenlogarithmen ergab, daß innerhalb der einzelnen Versuche mit zunehmender Dosis — soferne nur genügend hohe Dosen verabreicht

wurden — entweder das Erreichen eines maximalen Grenzwertes der Kaliumabgabe angedeutet war oder, wie dies in Versuch KK 14 und KK 17 der Fall war, nach Überschreiten eines Maximums der Kaliumabgabe bei weiterer Erhöhung der Dosen eine Abnahme der Kaliumfreisetzung eintrat. Aus diesem Grunde erschien die Berechnung einer Dosis-Wirkungsgeraden in Analogie zu den Resultaten von Abschnitt A 1 unzweckmäßig; vielmehr beschränkten wir uns darauf, in Abb. 2 den tatsächlichen Verlauf der einzelnen Versuche, deren Daten in Tab. 1, Spalte 9 angegeben wurden, graphisch darzustellen. Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungsbeziehung für Einzelinjektionen von ACh am denervierten Bein ohne Eserinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit eingezeichnet, der die Daten von [9] zugrunde liegen. Im Bereiche der Grenzdosis von ACh tritt dabei durch den Zusatz von Eserin ($10^{-7}$—$5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) keine nennenswerte Verstärkung der kaliumfreisetzenden Wirkung von ACh in Erscheinung, während die Meßpunkte bei höheren Dosen mit einer einzigen Ausnahme nach Richtung höherer Kaliumfreisetzung im Vergleich zur Dosis-Wirkungsgeraden der Versuche ohne Eserinzusatz verlagert sind. Auffallend ist ferner die von Versuch zu Versuch stark abweichende Steilheit der eingezeichneten Dosis-Wirkungsbeziehungen an der eserinisierten Muskulatur, die im Gegensatz zur verhältnismäßig geringen Streuung steht, die sowohl mit ACH als mit Tetramethylammonium [12] an nichteserinisierter innervierter und denervierter Muskulatur beobachtet wurde.

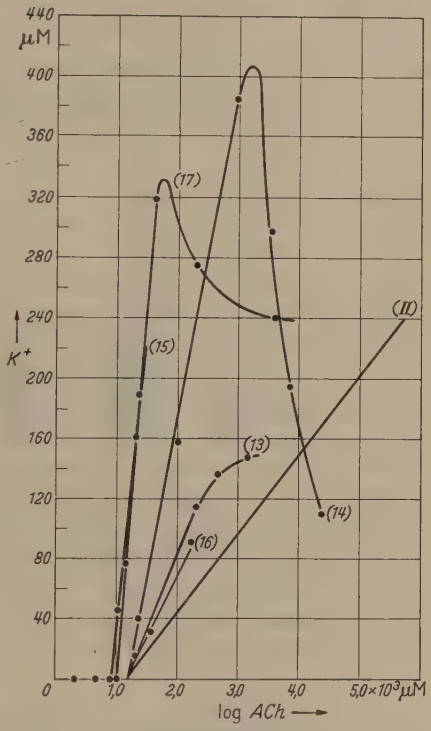



Abb. 2. Dosis-Wirkungskurven der Kaliumfreisetzung durch ACh an den unter Eserineinwirkung stehenden denervierten hinteren Extremitäten von Katzen. Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung von ACh an der nichteserinisierten denervierten Skeletmuskulatur (II) mit eingezeichnet. Ordinate: µM Kaliumionen; Abszisse: Logarithmen der ACh-Dosen in $\mu M \cdot 10^3$.

Das durch den Eserinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit bewirkte unterschiedliche Verhalten an der denervierten Extremität geht auch aus den in Abb. 3 gegebenen Gegenüberstellungen hervor: die Teilbilder

*a*—*e* veranschaulichen Größe und zeitlichen Ablauf der Kaliumabgabe aus innervierter (schwarz) und denervierter (umrandet) Muskulatur nach Einzelinjektionen von ACh in steigender Dosis, während in den

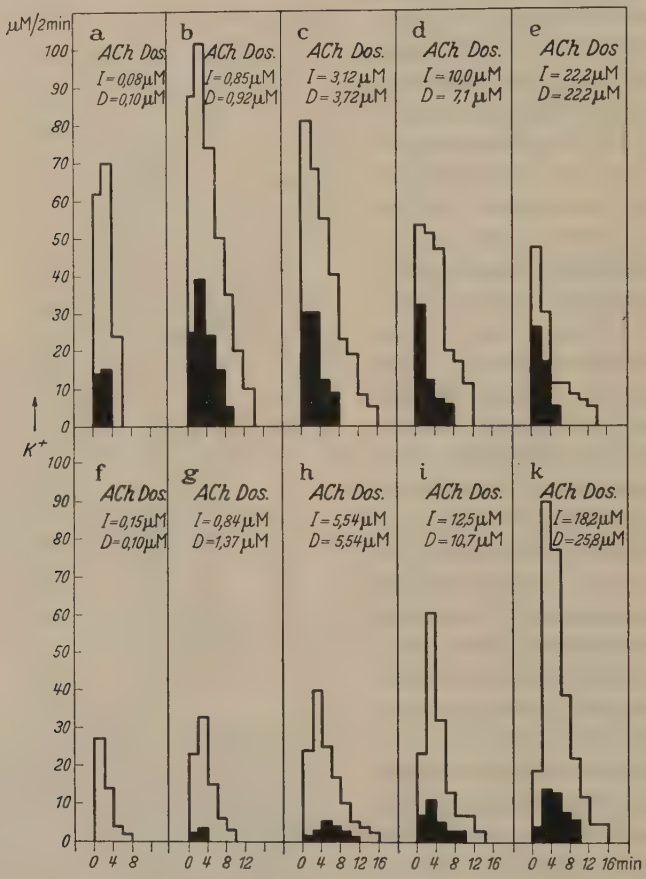



Abb. 3. Kaliumfreisetzung aus der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur der hinteren Extremitäten von Katzen nach einmaligen intraarteriellen Injektionen von ACh. In den Versuchen der Teilabbildungen *a*—*e* wurde der Durchströmungsflüssigkeit Eserin in einer Konzentration von $10^{-7}$ Mol/l zugesetzt. Ordinaten: Kaliumabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in µM/2 min. Abszisse: Zeit in Minuten. Leer umrandete Felder: Kaliumabgabe aus der denervierten, ausgefüllte Felder: Kaliumabgabe aus der innervierten Muskulatur.

Teilbildern *f*—*k* analoge Ergebnisse bei Durchströmung mit eserinfreier Blut-Tyrodelösung dargestellt sind; mit steigender Dosis nimmt dabei ohne Eserinzusatz die Höhe der maximalen Kaliumabgabe sowie die Zeitdauer der vermehrten Kaliumabgabe aus der innervierten und denervierten Muskulatur in der schon beschriebenen Weise[9] zu; unter Eserinzusatz hingegen kommt es nach höheren Dosen zu einer Verringerung der

maximalen Kaliumabgabe bei etwa gleichbleibender Gesamtdauer des Bestehens eines gegenüber den Kontrollperioden vermehrten Kaliumübertrittes. Dieser Effekt ist beim innervierten Bein nur andeutungsweise zu bemerken und mit den vorliegenden Beobachtungen nicht sicherzustellen. Die Gesamtzeitdauer der vermehrten Kaliumabgabe aus der Muskulatur nach intraarteriellen Einzelinjektionen von ACh ist bei Anwesenheit von Eserin in der Durchströmungsflüssigkeit in keiner Weise gegenüber den Versuchen mit ACh allein verlängert.

Aus der Betrachtung der Tab. 1 sowie der Abb. 1 geht ferner hervor, daß in den Versuchen mit Eserindurchströmung die Abgabe von Kaliumionen aus dem denervierten Bein bei vergleichbaren Dosen von ACh durchwegs größer ist, als die aus der innervierten Extremität.

Der Unterschied ist allerdings, wie aus einem Vergleich der Abb. 1 und 2 hervorgeht im Bereiche der Grenzdosen von ACh gering, wird aber bei höheren Dosen von ACh zunehmend größer. Ein signifikanter Unterschied der mittleren Höhe der Kaliumabgabe im untersuchten Dosenbereich konnte mit Hilfe eines STUDENT-T-Testes in folgender Weise gesichert werden: hierzu war es zunächst notwendig zu zeigen, daß die mittlere Differenz an innervierter und denervierter Extremität einander entsprechender Dosenpaare nicht signifikant von Null verschieden war; sie betrug 0,195 zugunsten des innervierten Muskels, woraus sich unter Berücksichtigung der Streuung ein Wert von $t = 1{,}423$ errechnete. Bei der gegebenen Zahl von 18 Freiheitsgraden ist dadurch ein Wert von $P > 0{,}1$ bestimmt, woraus folgt, daß die beobachtete mittlere Dosendifferenz als nicht signifikant von Null verschieden zu betrachten ist. Es war daher möglich die mittlere Differenz der Kaliumabgabe aus innervierter und denervierter Muskulatur nach dem gleichen Verfahren auf ihre Signifikanz zu prüfen: die mittlere Differenz betrug 119,7 $\mu$M Kaliumionen zugunsten der denervierten Muskulatur und erwies sich als signifikant von Null verschieden ($t = 6{,}8$; $P < 0{,}001$).

### *B) Kaliumfreisetzung durch intraarterielle Einzelinjektionen von ACh bei gleichzeitiger Anwesenheit von d-Tubocurarin in der Durchströmungsflüssigkeit.*

Weder an der innervierten noch an der denervierten Muskulatur trat bei Durchströmung mit Blut-Tyrodeverdünnungen, denen dTC in Konzentrationen von $10^{-7}$ bis $10^{-4}$ Mol/l zugesetzt war, eine nennenswerte Änderung der Größe der Spontanfreisetzung von Kaliumionen gegenüber den Versuchen ohne dTC-Zusatz ein. An der innervierten Muskulatur kam es nur in einem Versuch (KK 12) bei zwei Dosen (siehe Tab. 2, Spalte 4) zu einer analytisch einwandfrei vermehrten Kaliumionenfreisetzung.

An der denervierten Muskulatur trat ab einer Grenzdosis von etwa 0,1 $\mu$M ACh eine nachweisbare Freisetzung von Kaliumionen auf. Die in den Versuchen der Tab. 2 bei höheren ACh-Dosen auftretende Streuung der Werte der Kaliumabgabe läßt innerhalb des Konzentrationsbereiches von $10^{-4}$ bis $10^{-7}$ Mol/l dTC keine sichere Abhängigkeit der Kaliumabgabe von der dTC-Konzentration erkennen. Aus diesem Grunde wurden sämtliche Wertepaare der Tab. 2 ohne Rücksicht auf die

verwendete dTC-Konzentration zur Berechnung einer Dosis-Wirkungsbeziehung herangezogen. Die nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate berechnete Gerade lautet:

$$y = -37{,}190 + 18{,}944\,x \qquad \text{(II)}$$
$$r = 0{,}788$$
$$8{,}55 < \beta < 29{,}33$$

(Bedeutung der Symbole wie bei Gleichung I.)

Die in Tab. 2 angegebenen experimentell gefundenen Werte für die Kaliumausschüttung der denervierten Muskulatur sowie die oben er-

*Tabelle 2.*

| Vers.-Nr. | Denerv. Dauer Tage | innerviert | | denerviert | | | | dTC-Konz. Mol/l |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ACh-Dosis in $\mu$M | $K^+$Abg. in $\mu$M | ACh-Dosis in $\mu$M | log. Dosis ACh | $K^+$Abg. in $\mu$M | Fluß cm³/min | |
| KK 8 | 9 | 0,58 | 0 | 0,53 | 0,724 —1 | 9,0 | 14 | $10^{-5}$ |
| KK 8 | 9 | 23,5 | 0 | 20,5 | 1,312 | 46,5 | 17 | $10^{-5}$ |
| KK 8 | 9 | 11,0 | 0 | 11,0 | 1,041 | 38,0 | 27 | $10^{-5}$ |
| KK 9 | 9 | 53,0 | 0 | 35,0 | 1,544 | 52,0 | 12 | $10^{-7}$ |
| KK 9 | 9 | 13,5 | 0 | 8,6 | 0,934 | 19,0 | 14 | $10^{-7}$ |
| KK 11 | 13 | 0,03 | 0 | 0,026 | 0,415 —2 | 0 | 22 | $10^{-6}$ |
| KK 11 | 13 | 0,056 | 0 | 0,054 | 0,732 —2 | 0 | 20 | $10^{-6}$ |
| KK 11 | 13 | 0,28 | 0 | 0,27 | 0,431 —1 | 15,0 | 20 | $10^{-6}$ |
| KK 11 | 13 | 2,89 | 0 | 2,63 | 0,419 | 43,0 | 16 | $10^{-6}$ |
| KK 12 | 11 | 4,10 | 0 | 4,70 | 0,672 | 13,0 | 14 | $10^{-6}$ |
| KK 12 | 11 | 15,30 | 22,0 | 10,15 | 1,008 | 52,0 | 16 | $10^{-6}$ |
| KK 12 | 11 | 49,5 | 50,0 | 39,0 | 1,591 | 68,0 | 15 | $10^{-6}$ |
| KK 12 | 11 | 12,8 | 0 | 9,4 | 0,973 | 20,0 | 11 | $10^{-4}$ |

rechnete Gerade (II) und die zugehörigen Konfidenzintervalle der Mittelwerte der ACh-Dosen sind in Abb. 4 im Vergleich zur Dosis-Wirkungsbeziehung von ACh am nicht curarisierten denervierten Muskel eingezeichnet.

Im Vergleich zur Dosis-Wirkungsbeziehung des uncurarisierten denervierten Muskels fällt zunächst auf, daß die aus den Versuchen der Tab. 2 errechnete ACh-Grenzdosis am curarisierten denervierten Muskel um rund eine Zehnerpotenz in den höheren Dosenbereich verschoben ist. Dieser Unterschied ist jedoch infolge der dabei stattfindenden Überschneidung der Konfidenzbereiche noch nicht als signifikant zu betrachten. Hingegen ist der Unterschied in der Steigung der beiden Dosis-Wirkungsgeraden signifikant (uncurarisierte denervierte Extremität: $41{,}57 < \beta < 66{,}49$[9]), wodurch bei einer höheren Kaliumabgabe ab etwa 20 $\mu$M zur Erzielung annähernd gleicher Kaliumausschüttungen an der curarisierten Extremität signifikant höhere ACh-Dosen verabreicht werden müssen.

## Besprechung der Versuchsergebnisse.

Im Vergleich zu den in einer früheren Arbeit[9] mitgeteilten Ergebnissen über die Freisetzung von Kaliumionen aus der innervierten und denervierten Muskulatur durch Einzelinjektionen von ACh treten bei Eserinzusatz die folgenden Unterschiede in Erscheinung:

An der innervierten Muskulatur ergab die statistische Auswertung der experimentell gefundenen Meßwerte eine Herabsetzung der Schwellendosis von ACh in bezug auf die Kaliumfreisetzung von einem solchen Ausmaß, daß dort eine Überschneidung der Konfidenzbereiche der linearen Dosis-Wirkungsbeziehungen von innervierter unter Eserineinwirkung stehender und denervierter nichteserinisierter Muskulatur eintrat (Abb. 1). Diese Empfindlichkeitssteigerung im niederen Dosenbereich von ACh kann zunächst durch die Cholinesterasehemmwirkung von Eserin erklärt werden; allerdings wird die Empfindlichkeitssteigerung mit höheren Dosen von ACh zunehmend geringer, was dadurch zum Ausdruck kommt, daß die Steigung der linearen Dosis-Wirkungsbeziehung des innervierten eserinisierten Muskels signifikant kleiner ist als die des denervierten Muskels ohne Eserineinwirkung. Daraus geht hervor, daß die Wirkung des Eserins in der vorliegenden Versuchsanordnung nicht ausschließlich durch seine Cholinesterasehemmwirkung bedingt ist, sondern daß die kaliumfreisetzende Wirkung des ACh durch Eserin auch noch in anderer Weise beeinflußt wird.

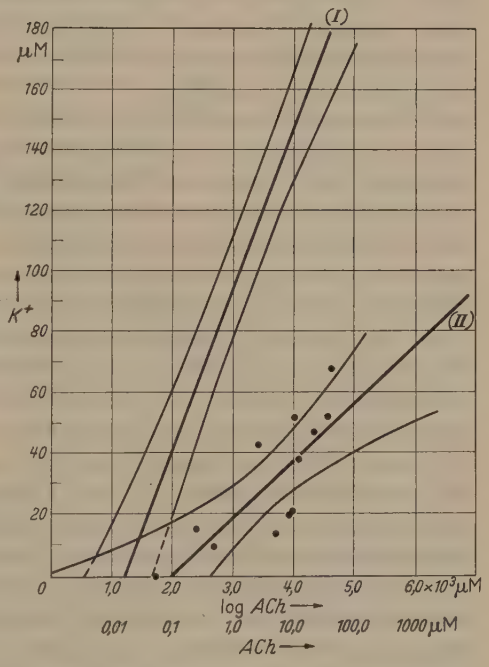



Abb. 4. Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch ACh an der unter dTC-Einwirkung stehenden denervierten Skeletmuskulatur der hinteren Extremitäten von Katzen (II). Zum Vergleich ist die Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch ACh an der nicht unter dTC-Einwirkung stehenden denervierten Skeletmuskulatur (I) miteingezeichnet. Ordinate: μM Kaliumionen Abszisse: Logarithmen der ACh-Dosen in μM · 10³.

Zum Unterschied von der innervierten Muskulatur konnte an der denervierten Extremität keine Herabsetzung der ACh-Schwellendosis für die Kaliumfreisetzung durch zusätzliche Eserineinwirkung beobachtet

werden (Abb. 2). Andererseits fällt auf, daß die in Abb. 2 eingezeichneten Dosis-Wirkungskurven für die unter Eserineinwirkung stehende denervierte Muskulatur im Bereiche niederer ACh-Dosen durchwegs bedeutend steiler verlaufen, als die in [9] bestimmte lineare Beziehung für die denervierte nichteserinisierte Muskulatur. Dieser Unterschied der Steilheiten des Dosis-Wirkungsbeziehungen kann auf folgende Weise einer Verlängerung der ACh-Wirkung auf die Endplatte durch die Cholinesterasehemmwirkung des Eserins zugeschrieben werden: Wie in [9] auf Grund der Theorie der „Kurzschlußdepolarisation" von Fatt u. Katz [5] näher abgeleitet wurde, ist die Steilheit der Dosis-Wirkungsbeziehung der Kaliumfreisetzung durch intraarterielle Einzelinjektionen von ACh durch die Größe der Fläche, durch die der Kaliumaustritt erfolgt (i.e. Endplattenregion) und durch die Zeitdauer der Einwirkung zu maximaler Depolarisation führender ACh-Konzentrationen bestimmt. Unter der Annahme, daß auch unter Eserineinwirkung der Kaliumaustritt ausschließlich durch die Endplattenregion erfolgt, können die beobachteten größeren Steilheiten der Dosis-Wirkungsbeziehungen unter Eserin durch eine Verlängerung der Dauer der depolarisierenden Wirkung am denervierten Muskel von ACh erklärt werden. Da jedoch in beiden Versuchsreihen die gleichen Durchströmungsbedingungen vorlagen, kann der Unterschied in der Zeitdauer der ACh-Wirkung nicht durch eine Verschiedenheit des zeitlichen Konzentrationsablaufes in der Extracellulärflüssigkeit bedingt sein; eine nennenswerte fermentative Spaltung von ACh in der Durchströmungsflüssigkeit wurde schon in [9] ausgeschlossen und scheidet auch deshalb für eine Erklärung des Zeitunterschiedes in der Wirkung aus, da bei Eserinzusatz keine Erniedrigung der wirksamen Grenzdosen und damit Grenzkonzentrationen von ACh zu beobachten war. Vielmehr bleiben zwei Erklärungsmöglichkeiten, die schon im Zusammenhang mit den Versuchen mit Tetramethylammonium [12] diskutiert wurden, nämlich entweder verlängerte Adsorption von ACh an der Receptoroberfläche oder tiefergreifende Veränderungen der Receptoroberfläche durch ACh, wobei Eserin entweder durch Verhinderung der fermentativen Spaltung an der Receptoroberfläche oder durch direkte Einwirkung auf die Receptoren hierfür die Voraussetzung schaffen kann.

Auf Grund der Annahmen der „Kurzschlußtheorie" ist die einer bestimmten Kaliumfreisetzung entsprechende Zeitdauer der maximalen Endplattendepolarisation durch die folgende Beziehung bestimmt (siehe auch Gl. VIII aus [9]):

$$t_d = \frac{Q}{A \cdot P \cdot (C_i - C_a)},$$

wobei im vorliegenden Falle: $A$ die Gesamtfläche aller Endplatten der Muskulatur einer Extremität, ($10^2$ cm$^2$), $C_i$ bzw. $C_a$ die intracelluläre bzw. extracelluläre Konzentration der Kaliumionen in Mol/l ($C_i - C_a : 10^{-1}$ Mol/l)

und $P$ eine Permeabilitätskonstante ($2{,}7 \cdot 10^{-7}$ cm · $sec^{-1}$) bedeuten. Daraus errechnen sich für die unter Eserineinwirkung am denervierten Bein beobachteten Werte der Kaliumausschüttung (Tab. 1) bei Dosen von $2 \cdot 10^{-8}$—$10^{-6}$ Mol ACh mittlere Depolarisationszeiten von 4—180 sec Dauer. Im Vergleich zu den analogen Werten für ACh am nichteserinisierten denervierten Muskel (siehe[9], Tab. 2) ergibt sich eine etwa 10fache Verlängerung der Depolarisationsdauer. Die Tatsache, daß die in Abb. 3 wiedergegebenen Diagramme über den zeitlichen Ablauf der Kaliumausschüttung einen nur verhältnismäßig geringen Einfluß von Eserin auf die Dauer der Kaliumabgabe erkennen lassen, scheint zunächst im Widerspruch zu der errechneten 10fachen Verlängerung der Depolarisationsdauer am denervierten Bein zu stehen. In vergleichenden Versuchen mit intraarteriellen Injektionen von Kaliumchlorid an der gleichen Durchströmungsanordnung waren jedoch folgende Feststellungen zu machen: Nach verschieden schneller Injektion (Injektionsdauer 1—20 sec) gleicher Dosen von Kaliumchlorid ließ sich zunächst kein Einfluß der Injektionsgeschwindigkeit auf die Dauer der vermehrten Ausscheidung im venösen Ausfluß nachweisen. Hingegen bestand eine Abhängigkeit von der verwendeten Dosis, insofern als je nach der injizierten Dosis von Kaliumchlorid (35—150 $\mu$M $K^+$) die Ausscheidungszeit 6—10 min betrug. Offenbar ist die Zeitdauer der Kaliumabgabe zunächst durch die Übertrittszeit der Kaliumionen zwischen intravasaler und Gewebsflüssigkeit bestimmt, wobei die Zeitdauer der Injektion bzw. der durch Endplattendepolarisation bewirkten Freisetzung von Kaliumionen zur Gesamtdauer nur additiv beiträgt. Daraus geht hervor, daß eine Verlängerung der Depolarisationsdauer auf 2—3 min nur eine ebensolange Verlängerung der Ausscheidungsdauer herbeiführen kann, die im Vergleich zur Zeitdauer der Kaliumausdiffusion nicht wesentlich ins Gewicht fällt, wobei überdies noch eine durch die Art der Probenahme (2 Minutenintervalle) bestehende Unsicherheit in der Bestimmung des genauen Endpunktes der Kaliumfreisetzung zu berücksichtigen ist.

Während der Verlauf der Dosis-Wirkungskurven der Kaliumausschüttung am eserinisierten denervierten Muskel im niederen Dosenbereich von ACh mit der Annahme einer Verlängerung der depolarisierenden Wirkung von ACh durch Fermenthemmung in Einklang steht, trat in zwei Versuchen, bei denen genügend hohe Dosen von ACh verabreicht wurden, ein abweichendes Verhalten auf. In diesen beiden Fällen trat ein Maximum der Kaliumfreisetzung ein, das bei weiterer Erhöhung der ACh-Dosen von einer steilen Abnahme der Größe der Kaliumionenabgabe gefolgt war. Dieses Verhalten erinnert an die Beobachtung von Burns u. Paton[1], wonach am Katzenmuskel C 10 bei wiederholter Verabreichung eine zunehmende Abschwächung seiner Depolarisationswirkung erfährt. Thesleff[11] hat vor kurzem gezeigt, daß während längerer Einwirkung von ACh am prostigminvorbehandelten Froschmuskel eine Wiederherstellung des Membranpotentials an der Endplatte eintritt; dabei verbleibt die Endplattenmembran, selbst nach Entfernung des ACh noch für längere Zeit gegenüber neuerlichem Zusatz von ACh unerregbar. Eine ähnliche

Veränderung würde die im Verlauf der beiden oben erwähnten Versuche aufgetretene Abschwächung der kaliumfreisetzenden Wirkung von ACh erklären.

Die Cholinesterasehemmwirkung des Eserins sowie die unter Eserin und hohen Dosen ACh angedeuteten Membranveränderungen stellen zusätzliche Streuungsquellen dar; die im Vergleich zu den in[9] beschriebenen Versuchen mit ACh ohne Eserinzusatz auffallend hohe Streuung der Meßwerte der Kaliumfreisetzung von Versuch zu Versuch findet dadurch eine Erklärung.

Bei den Versuchen mit dTC-Durchströmung muß hervorgehoben werden, daß an der innervierten Muskulatur die Kaliumfreisetzung durch intraarterielle Einzelinjektionen im untersuchten Dosenbereich von ACh und unter Verwendung von dTC-Konzentrationen von $10^{-4}$—$10^{-7}$ Mol/l praktisch völlig zum Verschwinden kam. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von Cicardo u. Moglia[2] sowie von Fenn, Koenemann u. Sheridan[7], wonach dTC die Kaliumabgabe aus der indirekt elektrisch gereizten Muskulatur verhindert. Auch die durch intraarterielle Injektion von Succinylbischolin an der hinteren Extremität von Katzen hervorgerufene Kaliumfreisetzung kann durch vorangehende Injektion von dTC für längere Zeit aufgehoben werden[8].

An der denervierten Muskulatur war im untersuchten Dosenbereich von ACh auch bei gleichzeitiger Durchströmung mit dTC-haltiger Blut-Tyrode-Verdünnung eine Kaliumausschüttung einwandfrei nachweisbar. Gegenüber dem nichtcurarisierten denervierten Muskel trat dabei ein Unterschied in den Grenzdosen sowie vor allem in der Steigung der Dosis-Wirkungsfunktion auf (Abb. 4), wobei die letztere unter dTC signifikant niederer war.

Eine Auswertung dieser Beobachtung im Sinne der „Kurzschlußtheorie" der Endplattenwirkung von ACh bedingt folgende Überlegungen: die Steigung der Dosis-Wirkungsbeziehung der Kaliumfreisetzung nach Einzelinjektion von ACh ist nach den Überlegungen der „Kurzschlußdepolarisation" unter Heranziehung des Zeitgesetzes des Konzentrationsablaufes von ACh in der extracellulären Flüssigkeit durch den Ausdruck:

$$\frac{A \cdot P \cdot (C_i - C_a)}{k_1} \text{ (siehe Gleichung XIII in [9])}$$

bedingt, wobei $A$, $P$, $C_i$ und $C_a$ die bei der Besprechung der Eserinversuche angegebene Bedeutung besitzen und $k_1$ die Zeitkonstante des Konzentrationsabfalles von ACh in der Extracellulärflüssigkeit darstellt. Der Wert von $k_1$ wurde in[9] mit $5 \cdot 10^{-2}$ $sec^{-1}$ bestimmt. Setzt man nun diesen Ausdruck für die Steigung dem früher angegebenen experimentell gefundenen Wert von 18,9 des Regressionskoeffizienten der Gleichung II (i.e. Dosis-Wirkungsgerade für die Kaliumfreisetzung durch ACh an der denervierten curarisierten Extremität mit Angabe der ACh-Dosen in logarithmischen Einheiten), wobei der Wert 18,9 zur Umrechnung in Mol noch mit einem Faktor $10^{-6}$ multipliziert werden muß, so ergibt sich folgende Gleichung für eine „Permeabilitätskonstante" von Kaliumionen durch die curarisierte Endplatte im Zustande der ACh Einwirkung:

$$P = \frac{1{,}89 \cdot 10^{-5} \cdot k_1}{A\,(C_i - C_a)} = 0{,}94 \cdot 10^{-7}\ \text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}\,.$$

Ein Vergleich mit dem von FATT[6] angenommenen Wert von $2{,}7 \cdot 10^{-7}$ cm· sec$^{-1}$ für die Permeabilitätskonstante der Kaliumionen an der nichtcurarisierten Endplatte ergibt, daß unter den in unseren Versuchen vorherrschenden dTC-Konzentrationen nach ACh-Injektion nur rund ein Drittel an Kaliumionen pro Zeiteinheit durchtritt als bei Abwesenheit von dTC. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß der Grad der maximalen Depolarisation der Endplatte durch ACh nach dTC verringert ist. ECCLES nimmt eine Herabsetzung des Ionendurchtrittes durch die Endplatte durch dTC nach Freisetzung von ACh auf ein Viertel des Wertes ohne dTC an, wobei die Übereinstimmung mit unserem Wert von ein Drittel durchaus befriedigend ist. Die zusätzlich durch die dTC-Wirkung auf die Endplatte auftretende relativ hohe Streuung unserer Versuchsergebnisse, ließ keinen Einfluß der verwendeten dTC-Konzentration auf Größe und Dosis-Abhängigkeit der Kaliumfreisetzung erkennen.

## Zusammenfassung.

1. An isoliert durchströmten Hinterextremitäten von Katzen wurde die Abgabe von Kaliumionen aus der Muskulatur an die Durchströmungsflüssigkeit nach intraarteriellen Einzelinjektionen von ACh unter gleichzeitiger Anwesenheit von Eserin bzw dTC bestimmt. Die Versuche wurden vergleichend an normal innervierten sowie chronisch denervierten Extremitäten durchgeführt.

2. Eserin führte in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-5}$—$10^{-7}$ Mol/l in der Durchströmungsflüssigkeit an der innervierten Muskulatur zu einer Herabsetzung der ACh-Schwellendosis für die Kaliumfreisetzung um rund 2 Zehnerpotenzen, während die Wirkung höherer ACh-Konzentrationen vergleichsweise bedeutend schwächer verstärkt wurde.

3. An der denervierten Muskulatur blieb die Schwellendosis der kaliumfreisetzenden Wirkung des ACh durch Einwirkung der in 2. angegebenen Eserinkonzentrationen unverändert. Hingegen trat unter Eserin an der denervierten Muskulatur in niederen ACh-Dosenbereichen eine bedeutend steilere Abhängigkeit der Kaliumfreisetzung vom Logarithmus der ACh-Dosen auf. Die Werte der Richtungskoeffizienten zeigten zwischen den einzelnen Versuchstieren eine große Streuung. Die Tatsache der größeren Steilheit der Dosis-Wirkungsbeziehung der Kaliumfreisetzung an der denervierten Muskulatur unter Eserin wurde als Hinweis auf eine verlängerte Depolarisationswirkung des ACh aufgefaßt.

4. An der eserinisierten denervierten Muskulatur konnte in einigen Fällen im Verlaufe des Versuches eine Umkehr der Dosis-Wirkungsfunktion bei höheren Dosen von ACh beobachtet werden, so daß bei

zunehmend höheren ACh-Dosen immer geringere Mengen von Kaliumionen abgegeben wurden.

5. Durchströmung mit dTC in Konzentrationen von $10^{-4}$—$10^{-7}$ Mol/l führte an der innervierten Extremität bis zu Dosen von 30—40 $\mu$M ACh zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Kaliumfreisetzung.

6. An der denervierten Muskulatur bewirkte dTC in den oben angegebenen Konzentrationen eine Erhöhung der wirksamen Schwellendosis von ACh sowie vor allem eine stark verringerte Abhängigkeit der Kaliumfreisetzung vom Logarithmus der ACh-Dosis. Aus dem geringeren Grad der Steigung der Dosis-Wirkungsfunktion ließ sich eine Verringerung des pro Zeiteinheit durch die Endplatte erfolgenden Kaliumionendurchtrittes auf ein Drittel des Wertes ohne dTC-Durchströmung abschätzen.

## Literatur.

[1] Burns, B. D., and W. D. M. Paton: Depolarisation of the motor endplate by decamethonium and acetylcholine. J. of Physiol. **115**, 41 (1951). — [2] Cicardo, V. H., and J. L. Moglia: Liberation du potassium musculaire par l'acetylcholine. Arch. internat. Physiol. **50**, 268 (1940). — [3] Eccles, J. C., B. Katz and S. W. Kuffler: Effect of eserine on neuromuscular transmission. J. of Neurophysiol. **5**, 211 (1942). — [4] Eccles, J. C., and W. V. Mac Farlane: Actions of anti-cholin-esterases on endplate potential of frog muscle. J. of Neurophysiol. **12**, 59 (1949). — [5] Fatt, P., u. B. Katz: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. of Physiol **115**, 320 (1951). — [6] Fatt, P.: The electromotive action of acetylcholine at the motor endplate. J. of Physiol. **111**, 408 (1950). — [7] Fenn, W. O., R. H. Koeneman and E. Sheridan: zitiert aus Fenn, W. O.: The role of potassium in physiological processes. Physiologic. Rev. **20**, 377 (1940). — [8] Klupp, H., u. O. Kraupp: Über die Freisetzung von Kalium aus der Muskulatur unter der Einwirkung einiger Muskelrelaxantien. Arch. internat. pharmacodynamie **98**, 340 (1954). — [9] Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger u. H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Azetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318 (1955). — [10] Kuffler, S. W.: Electric potential changes at an isolated nerve-muscle junction. J. of Neurophysiol. **5**, 18 (1942). — [11] Thesleff, S.: Neuromuscular block caused by Acetylcholine. Nature (Lond.) **175**, 594 (1955). — [12] Werner, G., O. Kraupp, W. Kobinger u. H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch Tetramethylammoniumbromid. Arch. exper. Path. u. Pharmakol., im Druck.

Dr. O. Kraupp, Wien/Österreich, Pharmakol. Institut d. Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 417—423 (1955).

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G. Berlin-West.

# Die Verteilung von $CNS'$, $S_2O_3''$ und $Li^+$ auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Perikardflüssigkeit beim nierenlosen Hund.

## (Ein Beitrag zur Dynamik der Verteilung.)

VI. Mitteilung.

Von

H. Langecker und E. Clerc*.

*(Eingegangen am 23. Juni 1955.)*

Die Untersuchung der Verteilung von Sulfanilsäure und einigen Sulfonamiden, die der Gruppe mäßig dissoziierter Säuren angehören, und Hexamethylentetramin, einer mäßig dissoziierten Base, haben ergeben, daß das Vorzeichen der Ladung Verteilungsvorgänge maßgebend beeinflußt (vgl. Mitt. I, II, III und V). Für die Frage, welche Rolle hierbei dem Dissoziationsgrad zufällt, schien es wünschenswert, nicht reaktive, wenig giftige Anionen und Kationen zu untersuchen, deren zugehörige Säuren bzw. Basen in wäßriger Lösung stark dissoziiert sind. Zu diesem Zweck wurde $CNS'$ (I), ferner $S_2O_3''$ (II) und $Li^+$ (III) ausgewählt.

### Methodik.

Bezüglich der in vitro- und in vivo-Verteilung vgl. Mitt. I. Die Bestimmung von I erfolgte nach E. Asmus. Das durch Chloramin unter Verwendung von $Fe^{III}$ als Katalysator gebildete Chlorcyan gibt mit Pyridin und Barbitursäure einen Polymethinfarbstoff. Blut, Serum und Ultrafiltrat wurden zur Enteiweißung mit 99% Äthylalkohol gefällt und die Analyse im eingedampften Filtrat ausgeführt. Bei der jodometrischen Bestimmung von II nach Newman wurden unter Verwendung der 1½ fachen Menge Wolframsäure stets klare Filtrate erhalten. III wurde Flammenphotometrisch in Blut-, Serum- und Ultrafiltrat-Verdünnungen von mindestens 1:10 durchgeführt.

$CNS'$ (I). Aus Tab. 1, in der die Verteilung von I auf die Blutphasen des Hundes dargestellt ist (Mittelwert aus 12 Versuchen), ergibt sich eine ganz geringfügige Bevorzugung der Wasserphasen und eine annähernd gleichgroße Bindung an Plasma- und Erythrocyteneiweiß. Nach Eichler wird I zum Teil an die Pseudo-Globulinfraktionen im Plasma gebunden, zum Teil dringt es in die Erythrocyten ein.

In Tab. 2 ist der Blutkonzentrationsabfall beim nierenlosen Hund nach i. v. Verabreichung von 46 mg/kg Natriumrhodanid dargestellt. Bei

* Herrn Professor Dr. Walter Schoeller zum 75. Geburtstag gewidmet.

dieser gut verträglichen Dosis tritt nach Goldstein noch kein HCN im Blut auf. Das Verteilungsgleichgewicht ist nach 50 min mit 27% erreicht. D'Amato fand 24,5%. Es ähnelt in der Größenordnung dem des Inulins. Nach 120 min beträgt die Konzentration in Subarachnoidalraum und Augenvorderkammer $^1/_{14}$, im Perikard knapp die Hälfte der Blut- bzw. $^1/_{10}$, respektive $^6/_{10}$ der Ultrafiltratkonzentration. Wallace fand beim Meerschweinchen in peritonealen Transudaten I-Konzentrationen, die

Tabelle 1. *Die Verteilung von Natriumrhodanid, Natriumthiosulfat und Lithium$^+$ auf die Phasen des Hundeblutes in vitro.*

| Substanz | mg-% im Blut | % der Gesamtmenge | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Erythrocyten | | Plasma | | Gesamtwasser |
| | | Wasser | Eiweiß | Eiweiß | Wasser | |
| Natrium-rhodanid | 80,0 | 15,9 | 19,5 | 20,7 | 43,8 | 59,7 |
| | 40,0 | 15,2 | 21,1 | 21,9 | 41,7 | 56,9 |
| | 20,0 | 14,0 | 22,4 | 23,6 | 39,0 | 53,0 |
| | 10,0 | 13,9 | 21,1 | 25,9 | 38,5 | 52,4 |
| Natrium-thiosulfat | 80,0 | 10,0 | — | 10,6 | 78,6 | 88,6 |
| | 40,0 | 9,9 | — | 13,8 | 76,3 | 86,2 |
| | 20,0 | 12,2 | — | 19,6 | 68,2 | 80,4 |
| | 10,0 | 8,5 | — | 12,3 | 79,2 | 87,7 |
| $Li^+$ | 20,0 | 15,7 | — | 23,8 | 60,6 | 76,3 |
| | 10,0 | 20,5 | — | 19,5 | 58,9 | 79,4 |
| | 5,0 | 16,0 | — | 19,7 | 64,9 | 80,9 |

den Plasma-Konzentrationen entsprachen. Es wird also Subarachnoidalraum und Vorderkammer viel langsamer von I aufgefüllt als der Herzbeutel. Man muß auch hier für I, ein Anion einer stark dissoziierten Säure, einen Membranwiderstand annehmen, da ja eine adsorptive Eiweißbindung für die eiweißarmen Flüssigkeiten keine Rolle spielt (5. Mitt.). Der Dissoziationsgrad der Säure scheint von geringerem Einfluß auf die Permeation zu sein, denn I dringt in den Subarachnoidalraum und Vorderkammer ebenso langsam ein, wie das Anion der mäßig dissoziierten Sulfanilsäure. Auffallend ist das Verhalten von I gegenüber den Erythrocyten. Es dringt leichter in die Erythrocyten ein als das Anion der Sulfanilsäure. Man kann dies nicht auf den Unterschied im Äquivalentgewicht der beiden Säuren beziehen (59:173), da II (s. sp.) mit einem Äquivalentgewicht von 57 in die Erythrocyten schwerer eindringt als I. Die an den Blutphasen beobachtete Verteilung läßt sich nicht auf andere Zellgrenzflächen übertragen, denn I bleibt, wie sein kleines Verteilungsvolumen besagt, extracellulär verteilt; es wird ja auch zur Bestimmung der extracellularen Flüssigkeit benutzt.

**$S_2O_3''$ (II).** Aus Tab. 1, in der die Verteilung von II auf die Blutphasen dargestellt ist (Mittel aus 6 Versuchen), ergibt sich eine besondere

Bevorzugung der Wasserphasen und eine geringfügige Adsorption an das Plasmaeiweiß. In die Erythrocyten dringt II nur wenig ein, ohne an das Erythrocyteneiweiß adsorbiert zu werden. Auch Kowalski sowie Cardozo beobachteten, daß II in die Erythrocyten eindringt und nicht an Albumin gebunden wird.

In Tab. 2 ist der Blutkonzentrationsabfall beim nierenlosen Hund nach i. v.-Verabreichung von 200 mg/kg Natriumthiosulfat (wasserfrei) dargestellt. Das Verteilungsgleichgewicht ist nach 60 min mit 37,3%, bezogen auf Blut, bzw. 25,2%, bezogen auf Plasma, erreicht. Gilman fand 21—24% und Cardozo 24%. Im Subarachnoidalraum beträgt die II-Konzentration nach 120 min $^1/_{10}$, in der Vorderkammer $^1/_6$ und im Herzbeutel sogar $^1/_1$ der Plasmakonzentration. Die Glomerulusendothelien sind für II leicht permeabel, denn es wird wie Kreatinin quantitativ filtriert (Kowalski). II dringt schwer in die Erythrocyten ein und überschreitet andere Zellgrenzflächen kaum. Der Subarachnoidalraum und die Vorderkammer werden viel langsamer aufgefüllt als der Herzbeutel; man muß an dieser Stelle gegenüber der gut dissoziierten Thioschwefelsäure einen Membranwiderstand annehmen. Eine Adsorption an Eiweiß kann in den eiweißarmen Flüssigkeiten keine Rolle spielen. Der Dissoziationsgrad der mäßig bzw. stark dissoziierten Säure beeinflußt die Permeabilität nur in geringem Ausmaß, da auch II nicht viel besser diffundiert als das Anion der Sulfanilsäure, trotzdem die Thioschwefelsäure nur $^2/_3$ des Molekulargewichts von Sulfanilsäure hat. Möglicherweise hat auch der Charakter der Thioschwefelsäure als zweibasische Säure einen Einfluß. Die Oxydation von II zu $SO''_4$ spielt bei der gewählten Versuchsanordnung keine Rolle (Gilman).

**$Li^+$ (III).** Aus Tab. 1, in der die Verteilung von III auf die Blutphasen (Mittelwert aus 11 Versuchen) dargestellt ist, ergibt sich eine ganz überwiegende Verteilung in den Wasserphasen und eine geringfügige Adsorption an Plasmaeiweiß. III dringt in die Erythrocyten ein, wird aber nicht an das Erythrocyteneiweiß adsorbiert. In Tab. 2 ist der Blutkonzentrationsabfall beim nierenlosen Hund nach Verabreichung von 150 mg/kg Lithiumchlorid = 24,5 mg III dargestellt. Das Verteilungsgleichgewicht wird nach 60 min erreicht mit einem Verteilungsvolumen von 49%, bezogen auf Blut, bzw. 35%, bezogen auf Plasma. Foulks gibt 40—60% an. Im Subarachnoidalraum beträgt nach 120 min der Gehalt an III 30% der Blut- bzw. Ultrafiltratkonzentration, im Kammerwasser fast 90% und in der Pericardflüssigkeit sind die Konzentrationen zu dieser Zeit größer als im Blut. In Übereinstimmung mit dem guten Eindringen in die Erythrocyten steht das große Verteilungsvolumen. III überschreitet offenbar auch die Gewebsflüssigkeit-Zellgrenzfläche leicht. In den Subarachnoidalraum tritt III langsam ein, so daß für diese Grenzfläche ein Membranhindernis besteht. In die Vorderkammer erfolgt der

Tabelle 2. *Natriumrhodanid-, Natriumthiosulfat- und $Li^+$-Konzentrationsablauf im intravenöser*

| | Minuten | mg% (m ± s) in Klammer | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 | 10 | 20 | 40 |
| Natriumrhodanid | Blut | 27,2 ± 1,03 (7) | | 20,0 ± 0,7 (6) | |
| | Plasma | 25,0 ± 2,26 (7) | | 17,0 ± 0,8 (6) | |
| | Liquor | 1,0 ± 0,5 (2) | | 1,4 ± 0,54 (3) | |
| | Kammerwasser | 2,9 ± 0,31 (4) | | 1,4 ± 0,43 (3) | |
| | Pericard-flüssigkeit | 8,4 | | 9,2 | |
| Natriumthiosulfat | Blut | 95,0 ± 5,62 (7) | 78,6 ± 4,9 (7) | 65,8 ± 2,4 (7) | 54,6 ± 3,15 (6) |
| | Plasma | 142,2 ± 1,64 (7) | 115,2 ± 5,5 (7) | 96,3 ± 3,54 (7) | 80,1 ± 4,07 (6) |
| | Liquor | | 5,3 | 5,4 ± 2,6 (2) | 4,1 ± 0,14 (2) |
| | Kammerwasser | | 10,8 | 7,1 ± 2,8 (2) | 8,8 ± 2,84 (2) |
| | Pericard-flüssigkeit | | | | |
| $Li^+$ | Blut | 12,0 ± 0,69 (11) | 8,5 ± 0,24 (10) | 7,0 ± 0,2 (10) | 6,0 ± 0,26 (5) |
| | Liquor | | 0,5 ± 0,14 (4) | 1,0 ± 0,27 (6) | 1,0 ± 0,1 (5) |
| | Kammerwasser | 2,0 (4) | | 2,0 (1) | 2,0 (1) |
| | Pericard-flüssigkeit | | | 9,5 (1) | 6,5 (1) |

Eintritt rascher. Hier wird der Diffusionsvorgang viel weniger durch Membraneinflüsse verzögert als im Subarachnoidalraum. Das Transudat liefernde Pericardendothel ist sehr gut für III durchlässig.

Es erfolgt demnach die Permeation des III, eines Kations einer stark dissoziierten Base, durch die Capillarendothelien auch mit einer gewissen Selektivität. Diese schafft Konzentrationsdifferenzen zwischen Gewebsflüssigkeit und Blutwasser, die sich von der gegenüber I und II, Anionen stark dissoziierter Säuren, unterscheidet. Zwischen der Verteilung von III und Hexamethylentetramin, Kationen, die Basen sehr differenten Dissoziationsgrades angehören, besteht hinsichtlich Verteilung trotzdem eine große Ähnlichkeit.

*Blut, Liquor, Kammerwasser- und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund nach Verabreichung.*

| Zahl der Versuche | | | | | Verteilungsvolumen % Körpergewicht |
|---|---|---|---|---|---|
| 50 | 60 | 90 | 120 | 240 | |
| 15,5 ± 0,94 (5) | | | 13,8 ± 0,61 (4) | 12,9 ± 0,6 (3) | |
| 12,7 ± 0,7 (5) | | | 10,9 ± 0,96 (4) | 9,9 ± 2,6 (3) | |
| 1,18 ± 0,5 (3) | | | 1,0 ± 0,8 (2) | 0,8 ± 0,4 (2) | |
| 1,18 ± 0,5 (3) | | | 1,07 ± 0,5 (2) | 0,8 ± 0,5 (2) | |
| 9,4 | | | 6,25 | 6,0 ± 0,6 (2) | 27,1 |
| | 51,1 ± 2,41 (6) | 46,9 ± 1,55 (5) | 43,6 ± 1,64 (5) | | |
| | 74,9 ± 3,54 (6) | 66,7 ± 2,57 (5) | 65,8 ± 2,66 (5) | | |
| | 3,6 ± 0,79 (3) | 4,6 ± 1,03 (3) | 6,5 ± 0,79 (4) | | |
| | 10,6 | | 11,5 ± 0,52 (3) | | |
| | 76,2 | | 60,9 ± 5,7 (5) | | 37,3 (Blut) 25,2 (Plasma) |
| | 5,0 ± 0,16 (5) | 5,0 ± 0,32 (4) | 5,0 ± 0,46 (3) | | |
| | 1,0 ± 0,2 (3) | 1,5 (3) | 1,5 (3) | | |
| | 3,5 (2) | 4,0 (1) | 4,5 ± 0,46 (3) | | |
| | 9,0 ± 0,63 (2) | 7,0 (1) | 9,0 ± 1,0 (3) | | 49,0 (Blut) 35,0 (Plasma) |

$Li^+$ ist unter den Alkaliionen das kleinste Kation und hat das größte Elektronenpotential. In Lösungen ist $Li^+$ zwei bis dreimal so stark hydratisiert wie $Na^+$ und $K^+$. Das hydratisierte $Li^+$ hat in wäßrigen Lösungen den größten effektiven Durchmesser, den niedrigsten Diffusionskoeffizienten, die geringste Lipoidlöslichkeit und die geringste Neigung zur Adsorption (Eichler). Es dringt ähnlich wie $K^+$ in die Zellen ein. Das Verteilungsvolumen überschreitet das der extracellularen Flüssigkeit beträchtlich, es scheint sich wie $K^+$ in den Zellen, und zwar im Zellwasser, anreichern zu können. Ein dem III ähnliches Verhalten hinsichtlich Verteilung ergaben orientierende Versuche mit Methylglucaminsulfat. Methode: Bestimmung des nach Perjodsäureoxydation

gebildeten Formaldehyds. Es scheint demnach bei Kationen weitgehend unabhängig vom Dissoziationsgrad der Basen, Eindringen in die Zelle und Diffusion in schwer zugängliche Räume ohne nennenswerte Widerstände vor sich zu gehen.

In Tab. 3 sind die untersuchten Stoffe hinsichtlich Molekulargewicht, $p_K$, Dissoziationsgrad, Verteilungsvolumen und der im Subarachnoidalraum nach Eintreten des Verteilungsgleichgewichts erreichten Konzentrationen zusammengestellt. Zur Beurteilung des $p_K$ wurde bei Sulfanilsäure und den Sulfonamiden von den zwei Funktionen die saure zur Beurteilung herangezogen, weil die geringe Basizität der zweiten Funktion sich praktisch nicht bemerkbar machen kann. Das $p_{K_b}$ des Anilins beträgt 9,4, das $p_{K_a}$ der p-Aminobenzoesäure 4,7 und das $p_{K_b}$ 11,7; das $p_{K_b}$ des Sulfanilamids 12,1. Aus dem $p_K$ der Verbindungen kann man unter Übertragung der Verhältnisse in wäßrigen Lösungen auf physiologische Flüssigkeiten für die in den Versuchen im Verteilungsgleichgewicht ermittelten Blutkonzentrationen gemäß dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz den Dissoziationsgrad bestimmen.

$$K_c = \frac{\alpha^2}{1\text{-}\alpha} \times C\,(\text{Mol1/1}),\quad {}^{-}p_K = \log K_c$$

Tabelle 3. *Beziehung von elektrischer Ladung und Dissoziationsgrad zur Verteilung.*

| Substanz | Mol.- bzw. Äquiv.-Gewicht | $p_{K_{a+}}$ * | $p_{K_{b+}}$ * | $\alpha$** | Vert. Vol.% Körpergewicht | Liquor/Blut Konzentr. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HCNS | 59,0 | 0 | | 1,0 | 27 | 0,07 |
| $H_2S_2O_3$ | 114,0 | 0 | | 1,0 | 37 | 0,1 |
| Sulfanilsäure | 173,0 | 3,2 | | 0,73 | 29 | 0,05 |
| Sulfacarbamid | 216,0 | 5,4 | | 0,065 | 35 | 0,07 |
| Sulfaäthylthiodiazol | 284,0 | 5,3 | | 0,082 | 34,7 | 0,05 |
| Sulfa-4-methyl-pyrimidin | 265,0 | 7,0 | | 0,013 | 50,0 | |
| Sulfathiazol | 266,0 | 7,1 | | 0,012 | 56,0 | |
| Sulfapyridin | 260,0 | 8,5 | | 0,0026 | 68 | |
| Sulfanilamid | 172,0 | 10,5 | 12,1 | 0,00002 | 69 | 0,66 |
| Hexamethylen-tetramin-OH | 158,0 | | 8,9 | 0,001 | 56 | 0,48 |
| Methylglucamin-OH | 216,0 | | 4,6 | 0,053 | ca. 45 | 0,42 |
| Li-OH | 24,0 | | 0 | 1,0 | 49 | 0,33 |

* Nach Bestimmung von Herrn Dr. Neudert.
** Für die im Verteilungsgleichgewicht herrschende Blutconzentration.

Aus Tab. 3 ergibt sich eine Beziehung zwischen Dissoziationsgrad bzw. $p_K$ der Säuren und Basen zur Permeation. Erst bei Verbindungen mit einem $p_{K_a} = 7{,}0$ wird die Permeation erleichtert und elektrisch nahezu neutrale Moleküle sowie Basen verschiedenen Dissoziationsgrades dringen gut ein. Offenbar wirkt sich hier die elektrische Ladung an

Membranen und Zellgrenzflächen aus. Das Verteilungsvolumen und das Verhältnis der Blut-Liquorkonzentration sind geeignete Teste für die Feststellung selektiver Permeabilitäten. Das $p_{K_a}$-Optimum scheint zwischen 8,5—10,5 zu liegen.

## Zusammenfassung.

CNS′ und $S_2O_3''$ bleiben bevorzugt extracellulär verteilt und diffundieren schwer in Subarachnoidalraum und Vorderkammer. $Li^+$ reichert sich auch im Zellwasser an und hat gegenüber dem Subarachnoidalraum und Vorderkammer nur einen geringen Widerstand zu überwinden. Die Versuche zeigen, daß sehr schwache Säuren, elektrisch nahezu neutrale Moleküle und Basen unabhängig vom Dissoziationsgrad gut permeieren. Die bei mäßig starken und starken Säuren auftretenden Widerstände werden mit der Ladung der Membran bzw. Grenzflächen in Beziehung gebracht. Das Verteilungsvolumen und das Verhältnis Blut/Liquorkonzentration ist ein geeignetes Kriterium für die Untersuchung von Permeabilitäten.

Fräulein U. Strauch und Herr N. Sprzagala haben bei der Durchführung der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet.

## Literatur.

D'Amato, H. E.: Amer. J. Physiol. **178**, 143 (1954). — Asmus, E., u. H. Gerschhagen: Z. anal. Chem. **138**, 414 (1953). — Cardozo, R. H., and I. S. Edelmann: J. Clin. Invest. **31**, 280 (1952). — Eichler, O.: Klin. Wschr. **1954**, 129. — Eichler, O., u. I. Appel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 472 (1951). — Foulks, J., G. H. Mudge and A. Gilman: Amer. J. Physiol. **168**, 642 (1952). — Gilman, A., F. S. Philips and E. S. Koelle: Amer. J. Physiol. **146**, 348 (1946). — Goldstein, F., and F. Rieders: Amer. J. Physiol. **167**, 47 (1951). — Kowalski, H. J., and D. D. Rutstein: J. Clin. Invest. **31**, 370 (1952). — Langecker, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 278 (1953). — Langecker, H., u. E. Schulze: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 160, 166 (1954). — Langecker, H., u. H. Loppnow: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 36 (1955). — Newman, E. V., A. Gilman and F. S. Philips: Bull. Johns Hopkins Hosp. **79**, 229 (1946). — Wallace, G. B., and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **61**, 397 (1937).

Professor Dr. Hedwig Langecker,
Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin N 65, Müllerstr. 170/2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 424—434 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn).

# Untersuchungen über die akute Zinkvergiftung.

Von
F. Hahn und R. Schunk.

*(Eingegangen am 30. Juni 1955.)*

Zink gehört zu den Metallen, deren toxische Wirkungen bei peroraler Vergiftung stark von den lokalen Reizwirkungen beherrscht werden (Eichholtz). Über den Anteil der resorptiven Wirkungen vermag man sich an Hand der Literatur kein klares Bild zu machen. Entsprechende Angaben sind in der kasuistischen Literatur nur teilweise vorhanden (vgl. Esser). In namhaften Lehrbüchern (Starkenstein; Flury u. Zangger; Patty; Goodman u. Gilman) findet sich sogar die Auffassung, daß das Zink zur Erzeugung von Allgemeinwirkungen nicht ausreichend resorbiert werde. Hier sprechen wohl im wesentlichen die praktischen Erfahrungen mit Zinkchlorid mit, das, von einigen wenigen Vergiftungsfällen durch Zinksulfat abgesehen, die Kasuistik der tödlichen Vergiftungen beherrscht (vgl. die Zusammenstellung von Esser). Sehr oft sind hochprozentige (50%ige) Zinkchloridlösungen getrunken worden, wobei die starken Ätzwirkungen besonders hervortraten und die Schlußfolgerung nahelegten, daß es bei der Zinkvergiftung mehr auf die Konzentration als auf die Dosis ankomme (Flury u. Zangger).

Das klinische Material dürfte aber kaum ausreichen, um die Beziehungen der Zinkwirkung zur Dosis und zur Konzentration unabhängig voneinander klarzustellen. Beim Trinken einer hochprozentigen Zinkchloridlösung ist gewöhnlich auch die aufgenommene Zinkmenge größer als bei niederprozentigen Lösungen bzw. bei den anderen Zinksalzen, bei denen so hochprozentige Lösungen wie beim Zinkchlorid nicht in Frage kommen. Reinere, von Ätzwirkungen nicht überlagerte Bilder resorptiver Wirkung werden daher wohl auch seltener zu Gesicht gekommen sein.

Die Frage nach der toxischen Wirkung niederer Konzentrationen hat auch für die Stoffe Bedeutung, die in der Magensäure erst löslich werden, wie das z. B. beim Zinkoxyd und Zinksulfid der Fall ist. Hier sind der auftretenden Chloridkonzentration durch die Stärke der Magensäure (0,3—0,4%) Grenzen gesetzt.

Diese Frage interessiert auch deshalb, weil ein Gemisch von Zinksulfid und Bariumsulfat, die sogenannte Lithopone, als Bestandteil der

weißen Farbsteine in Kindertuschkästen verwendet wird. Die mit einem etwaigen Verschlucken solcher Farbsteine verbundenen Gefahren können erst bei einer genaueren Kenntnis der toxischen Eigenschaften von Lithopone beurteilt werden. Lithopone mit je 1 Mol Zinksulfid und Bariumsulfat und einem Zinksulfidgehalt von rund 30% wird als „Rotsiegel" bezeichnet (vgl. Ullmann). Ein Lithopone mit einem 60%igen Zinksulfidgehalt heißt „Silbersiegel". Als „Sachtolith" bezeichnet man ein Zinksulfidpräparat ohne Bariumsulfat mit besonderen Pigmenteigenschaften. Das Zinksulfid ist in diesen Produkten zur Hebung der Deckfähigkeit einem Glüh- und Abschreckungsprozeß unterworfen worden.

## I. Zinkchlorid.

In Versuchen an Ratten prüften wir die Abhängigkeit einer peroralen Zinkchloridvergiftung von Dosis und Konzentration. Über einen Konzentrationsbereich von 2—50% ändert sich die mittlere letale Dosis von knapp 0,75 g/kg nicht und zeigt damit, daß die Zinkchloridvergiftung im Endeffekt unabhängig von der Konzentration ist. Nur der Vergiftungsablauf wies konzentrationsabhängige Unterschiede auf. Die Tiere starben durchschnittlich schneller, wenn die mittlere letale Dosis in niedrigeren Konzentrationen gegeben worden war. Die Todesrate in den ersten 24 Std sank von über 50% bei 2—5%igen Lösungen auf 0% bei 50%iger Lösung. Den Ausgleich brachten bei den 20—50%igen Lösungen Spättodesfälle nach $2^1/_2$—11 Tagen. Bei ihnen deckte regelmäßig ein schwerer Lokalbefund die Todesursache auf: Offene Magenperforationen mit Peritonitis, gedeckte Perforationen mit Netzverwachsungen oder Penetration ins Lebergewebe sowie Pylorusstenosen.

Leichtere lokale Schädigungen (narbige Schrumpfung des Magens, einfache Schleimhautulcera, abheilende penetrierte Ulcera) fanden sich noch bei einer Anzahl der überlebenden, nach 4—12 Wochen getöteten Tiere. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß diese Lokalbefunde dosis- und konzentrationsabhängig waren: bei 0,5 g/kg erst von 20% an, bei 0,75 g/kg schon ab 5% und mit steigender Konzentration in zunehmendem Prozentsatz.

Die Frühtodesfälle wiesen nur oberflächliche Schleimhautverätzungen und Blutungen auf. Als Todesursache sehen wir hier in erster Linie die resorptive Giftwirkung an, da wir bei diesen Tieren meist die typischen, zentralnervösen Symptome der Zinkvergiftung beobachteten: Tremor, Ataxie, gesträubtes Fell (Temperatursturz), Dyspnoe und Cyanose. Mit steigender $ZnCl_2$-Konzentration wurden diese Symptome schwächer und seltener. Der besonders charakteristische Zink-Tremor fehlte schließlich bei den Versuchen mit 50%iger Lösung ganz.

Lokale und resorptive Wirkungen weisen somit im mittleren und unteren Letalitätsbereich eine gleichsinnige Abhängigkeit von der Dosis,

jedoch eine gegensinnige Abhängigkeit von der Konzentration auf. Offenbar schließen sich lokale und resorptive Zinkchloridwirkungen bis zu einem gewissen Grade gegenseitig aus. Die Unabhängigkeit der $ZnCl_2$-Letalität von der Konzentration, die zunächst überraschend erscheint, findet damit eine Erklärung.

Tabelle 1. *Perorale Zinkchloridvergiftung bei der Ratte (Schlundsondenfütterung).* Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die Tierzahl mit pathologischem Magenbefund (siehe Text).

| Dosis g/kg | Konzentration % | Tierzahl | Tod nach | | | | Überlebende | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2—24 Stunden | 24—48 Stunden | 48—84 Stunden | 6—11 Tagen | Zahl | getötet nach (Tagen) |
| 1. 0,5 | 2 | 2 | — | — | — | — | 2 | 85 |
| | 5 | 2 | — | — | — | — | 2 | 85 |
| | 10 | 2 | 1 | — | — | — | 1 | 85 |
| | 20 | 5 | — | — | — | — | 5 (2) | 60—85 |
| | 50 | 4 | — | — | — | 1 (1) | 3 (2) | 28 |
| 2. 0,75 | 2[1] | 15 | 7 | 1 | 1 | 1 | 5 | 50—85 |
| | 5 | 12 | 8 | — | 1 | — | 3 (1) | 51—82 |
| | 10 | 5 | 2 | — | — | — | 3 (1) | 51—83 |
| | 20 | 10 | 3 | — | — | 3 (3) | 4 (2) | 50—83 |
| | 50 | 6 | — | — | 3 (3) | 1 (1) | 2 (2) | 28 |
| 3. 1,0 | 2[1] | 2 | 2 | — | — | — | 0 | — |
| | 5 | 2 | 2 | — | — | — | 0 | — |
| | 10 | 2 | 1 | — | 1 | — | 0 | — |
| | 20 | 5 | 3 | 2 | — | — | 0 | — |
| | 50 | 2 | 2 | — | — | — | 0 | — |

[1] Bei Verwendung 2%iger Lösung wurde die Dosis von 0,75 g/kg bei 7 Tieren auf 2 gleichgroße Gaben in 3stündigem Abstand verteilt. Hiervon starben 4 Tiere. Von den übrigen 8 Tieren, die die Dosis auf einmal erhielten, starben 6. Die Dosis 1 g/kg wurde in 2%iger Lösung nur auf 2 Gaben verteilt gegeben.

Tabelle 2. *Wirkung von peroral gegebenem Zinkchlorid bei Kaninchen.*

| Dosis g/kg | Konzentration % | Zahl | Tod nach | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 Tag | 2 Tagen | 3 Tagen | 13 Tagen |
| 0,25 | 5 | 2 | — | — | — | — |
| | 20 | 2 | — | — | — | 1 perfor. Ulcus |
| 0,5 | 5 | 3 | — | 1 | — | — |
| | 20 | 3 | 1 | 1 | 1 perfor. Ulcus | — |
| 1,0 | 5 | 2 | 1 | 1 | — | — |
| | 20 | — | — | — | — | — |

Bei der absolut letalen Dosis von 1,0 g/kg fielen auch bei den höheren Konzentrationen die Spättodesfälle mit schweren Lokalbefunden weg. Offenbar wird hier genügend resorbiert, um den akuten Tod herbeizuführen.

Orientierende Versuche am Kaninchen mit 5- und 20%iger Lösung ergaben ein ähnliches Bild (Tab. 2): Spättodesfälle mit Perforation nach 3—13 Tagen nur bei der höheren Konzentration; Frühtodesfälle nur abhängig von der Dosis. Eine gegensinnige Abhängigkeit von der Konzentration ist hier vielleicht wegen der geringen Versuchszahl nicht erkennbar.

Aus der Größe der intravenösen letalen Dosis bei Ratten (Tab. 3) folgt, daß mindestens $^1/_{30}$der verabreichten Dosis vom Magen-Darmkanal aus resorbiert wird. Annähernd die gleiche Menge wird auch bei subcutaner Injektion aufgenommen. Dagegen erscheint die Resorption bei

Tabelle 3. *Zinkchloridwirkung bei intravenöser, intraperitonealer und subcutaner Verabreichung bei Ratten.*

Letalität = Zahl der gestorbenen Tiere/Gesamtzahl.

| Dosis g/kg | Konzentration % | intravenös | | intraperitoneal | | subcutan | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Letalität | Zeit | Letalität | Zeit | Letalität | Zeit |
| 0,02 | 0,5 | 0/11 | — | — | — | — | — |
| 0,03 | 0,5 | 10/10 | 2 min bis 3 Tg. | — | — | — | — |
| 0,05 | 0,5 | — | — | 3/6 | 6 Std bis 5 Tg. | — | — |
| 0,1 | 0,5 | — | — | 2/2 | 5—12 Std | — | — |
| 0,5 | 5 | — | — | — | — | 3/6 | 7 Std, 12 u. 34 Tg. |
| 1,0 | 5 | — | — | — | — | 5/6 | 12 Std bis 3 Tg. |

intraperitonealer Injektion einer verdünnten Lösung (0,5%) wesentlich günstiger, da die letale Dosis hierbei gegenüber der intravenösen nur etwa doppelt so groß ist.

Bei der Berechnung der Resorptionsgröße muß allerdings ein gewisser Entgiftungsfaktor bei langsam ablaufender Resorption in Rechnung gestellt werden. Für eine rasche Entgiftung des Zinks spricht die geringe Kumulationsneigung, welche es z. B. erlaubt, $^2/_3$ der absolut letalen Dosis (d. h. 0,02 g/kg) an mindestens 7 aufeinander folgenden Tagen intravenös zu injizieren. Eine Gewöhnung an das Zink spielt dabei keine Rolle, insofern wenigstens, als wir nach 4maligen Gaben von je 0,02 g/kg am 5. Tage 0,03 g/kg noch voll wirksam fanden.

Auch intravenös kommt es zu den typischen nervösen Erscheinungen. Es ist gelegentlich die Vermutung ausgesprochen worden, daß die Wirkung der intravenösen Zinkchloridinjektion mit den Flockungsvorgängen am Bluteiweiß zusammenhinge (vgl. Schwartze u. Alsberg). Nach eigenen in vitro-Versuchen treten Eiweißfällungen im Serum bei Konzentrationen auf, die bei der intravenösen Injektion tödlicher Dosen

durchaus erreicht werden könnten. Jedoch ließ sich durch Natriumthiosulfat (7,22 Teile zu 1 Teil Zinkchlorid, vgl. Lebduska) die Serumfällung aufheben, ohne daß die tödliche Wirkung verhindert wurde. Thiosulfat wurde allein in 5facher Dosierung intravenös vertragen.

Dagegen wurde die perorale Toxicität des Zinkchlorids durch Natriumthiosulfat erhöht. Die mittlere letale Dosis konnte auf 0,25 g/kg (5%ig), d. h. um das 3fache durch Zusatz von 1,8 g/kg Thiosulfat

Tabelle 4. *Wirkung von Sulfactin (S) auf die intravenöse und perorale Zinkchloridvergiftung bei Ratten.*

| Dosis und Verabreichungsform | | Tierzahl | Tod nach 15 min | 2—5 Std | 6—12 Std | 1 Tag | 2—3 Tagen | 4—5 Tagen | 9—14 Tagen | 38 Tagen | überlebend und getötet nach 38—5 Tagen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,03 g/kg i.v. 0,5% | ohne S | 10 | 5 | 1 | — | 2 | 2 | — | — | — | — |
| | mit S | 10 | 1 | — | — | — | 2 | 2 | 1 | — | 4 |
| 0,75 g/kg per os 5% | ohne S | 12 | — | 2 | 5 | 1 | 1 | — | — | — | 3 (1 U) |
| | mit S | 12 | — | — | 2 | — | — | 1 | 3 | 1 U[2] | 5 |
| | | | | | | | | | (1 U)[1] | | |
| 1 g/kg per os 5% | ohne S | 2 | — | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — |
| | mit S | 7 | — | 4 | 2 | — | — | 1 U[3] | — | — | — |

U = kleines Schleimhautulcus, U[1] = penetrierendes Ulcus, U[2] = perforiertes Ulcus, U[3] = Ulcus mit Pylorusstenose.

*Technik der Sulfactinbehandlung.* 1. Bei intravenöser Zinkchloridinjektion: 3 Std vor, $^1/_2$ Std nach der Zinkgabe und am folgenden Tage je 50 mg/kg S. subcutan. Oder: 1 Std vor, 5 Std nach der Zinkgabe und am folgenden Tage je 20 mg/kg S. i. p. sowie am übernächsten Tage 10 mg/kg.

2. Bei peroraler Zinkvergiftung: $1^1/_2$ Std vor, 15 min und 4 Std nach der Zinkfütterung je 50 mg/kg S. subcutan. Oder: 1 Std vor, 1,3 und 5 Std nach der Zinkgabe sowie am folgenden Tage 20 mg/kg und am übernächsten Tage 10 mg/kg S. i. p.

gesenkt werden. Die 6fache Menge Thiosulfat allein wurde überlebt. Auf die Wirkung intravenöser subletaler Dosen (0,02 g/kg) hatte das Thiosulfat keine toxicitätssteigernde Wirkung. Zweifellos wird also durch die Hemmung der lokalen Ätzwirkung die Resorption unter Einfluß von Thiosulfat begünstigt, wobei die Komplexfestigkeit nicht ausreicht, um die Giftwirkung nach der Resorption zu verhindern.

Die Letalität nach intravenösen Zinkchloridgaben ließ sich aber durch parenterale Vor- und Nachbehandlung der Ratten mit BAL (Sulfactin „Homburg") unter Abschwächung der nervösen Symptome deutlich herabsetzen (Tab. 4) und der Vergiftungsablauf bei den nicht geretteten Tieren zeitlich erheblich verzögern.

Mit der parenteralen Sulfactinbehandlung mußte sich auch die resorptive Wirkung peroraler Zinkgaben beeinflussen und dadurch ihr Anteil an der Gesamtvergiftung darstellen lassen. Die Tab. 4 zeigt, daß

die akute Letalität in der Tat stark herabgesetzt wird. Dagegen wird die Zahl der Spättodesfälle unter Auftreten der bei dieser Konzentration sonst nicht üblichen schwereren Ulcera erhöht. Die Tiere werden also durch die Sulfactinbehandlung in ein Stadium hinübergerettet, in dem sich die nicht beeinflußten lokalen Schädigungen auswirken können. Bei der sonst nicht akut zum Tode führenden höheren Dosis von 1 g/kg sahen wir unter Sulfactin einmal eine schwere lokale Schädigung (Pylorusstenose) mit Spättod. Die Letalitätssenkung durch Sulfactin bleibt deshalb nur gering.

Tabelle 5. *Akute Toxicität von Zinksulfat und -acetat bei Ratten (Tod nach 1—4 Tagen).* Letalität = Zahl der gestorbenen Tiere/Gesamtzahl der Versuchstiere. Die höchste Zinksulfat- und -acetatkonzentration mußte heiß bereitet und 30° C warm gehalten werden.

| Salz und Verabreichungsform | Dosis g/kg ausgedrückt durch die isomolare $ZnCl_2$-Menge | Konzentration % ausgedrückt durch die isomolare $ZnCl_2$-Menge | Letalität | Konzentration ausgedrückt durch die isomolare $ZnCl_2$-Menge % | Letalität | Konzentration ausgedrückt durch die isomolare $ZnCl_2$-Menge % | Letalität |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | | | | | | | |
| per os | 0,5 | 5 | 0/2 | 20 | 0/4 | 50 | 0/4 |
| | 0,75 | 5 | 3/4 | 20 | 7/12[1] | 50 | 3/6 |
| | 1,0 | 5 | 4/4 | | | | |
| subc. | 0,5 | 5 | 0/4 | | | | |
| | 1,0 | 5 | 3/4 | | | | |
| i. p. | 0,05 | 0,5 | 1/4 | | | | |
| | 0,1 | 0,5 | 4/4 | | | | |
| i. v. | 0,02 | 0,5 | 1/3 | | | | |
| | 0,03 | 0,5 | 2/2 | | | | |
| $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ per os | 0,5 | 5 | 0/2 | 20 | 0/4 | | |
| | 0,75 | 5 | 2/4 | 20 | 5/12 | | |
| | 1,0 | 5 | 3/4[2] | | | | |
| subc. | 0,5 | 5 | 0/4 | | | | |
| | 1,0 | 5 | 4/4 | | | | |
| i. p. | 0,05 | 0,5 | 1/4 | | | | |
| | 0,1 | 0,5 | 4/4 | | | | |
| i. v. | 0,02 | 0,5 | 0/2 | | | | |
| | 0,03 | 0,5 | 2/2 | | | | |

[1] Zwei weitere Tiere starben nach 12 bzw. 16 Tagen ohne Magenbefund, davon eins an schwerer degenerativer Herzveränderung.

[2] Ein weiteres Tier starb nach 15 Tagen an Magenperforation und Peritonitis.

## II. Zinksulfat und Zinkacetat.

In den letalen Dosen von Zinksulfat und Zinkacetat bestand kein Unterschied gegenüber isomolaren Mengen von Zinkchlorid bei peroraler, subcutaner, intravenöser und intraperitonealer Zufuhr (Tab. 5). Es

entfielen jedoch die Spättodesfälle mit Perforation der Magenwand nach peroraler Applikation (mit Ausnahme einer Ratte, die 15 Tage nach Zinkacetat in einer Dosis, die 1 g/kg Zinkchlorid in 20%iger Lösung entsprach, starb). Das Zinkacetat konnte wegen der geringeren Wasserlöslichkeit in der höchsten, dem 50%igen Zinkchlorid entsprechenden Konzentration nicht geprüft werden. Entsprechend der geringeren Ätzwirkung standen beim Sulfat und Acetat auch bei den hohen Konzentrationen die schnellen Resorptivwirkungen im Vordergrund. Bei der Sektion der überlebenden und nach 4 Wochen getöteten Tiere war die Magenschleimhaut nach der Sulfatvergiftung frei von makroskopisch sichtbaren Veränderungen. Nur nach Zinkacetat waren bei 1 von 7 Tieren bei der mittleren letalen Dosis in 20%iger Lösung ein penetrierendes Ulcus, ferner bei je einem weiteren Tier ein abgeheiltes Ulcus mit Narbenbildung und ein vernarbtes und mit der Leber verwachsenes Ulcus festzustellen.

Nach subcutaner Injektion entwickelten sich im Verlaufe von etwa 1 Woche die gleichen Hautnekrosen wie bei Zinkchlorid. Nach intraperitonealer Applikation ergab der Sektionsbefund der nach 4—5 Wochen getöteten Tiere die gleichen Anzeichen einer abgelaufenen Peritonitis wie nach Zinkchlorid.

### III. Zinksulfid, Lithopone, Sachtolith und Zinkoxyd.

**1. Versuche an Ratten.** Für diese Versuche wurden 20%ige Aufschwemmungen mit Traganthzusatz mit der Schlundsonde verfüttert. 4 Wochen lang wurde das allgemeine Verhalten und das Körpergewicht kontrolliert.

*Technisches Zinksulfid.* Versuche an 18 Tieren ergaben eine Verträglichkeit bis 20 g/kg. Die Höchstdosis wurde an 8 Tieren geprüft.

*Sachtolith.* 5 Tiere überlebten 20 g/kg, 10 Tiere 40 g/kg.

*Lithopone „Rotsiegel".* Je 3 Tiere überlebten 10 g/kg und 20 g/kg.

*Lithopone „Silbersiegel".* 5 Tiere erhielten 20 g/kg, 10 Tiere 40 g/kg. Von beiden Gruppen starb je 1 Tier nach 13 bzw. 10 Tagen an einer Pneumonie. Die übrigen Tiere überlebten.

*Zinkoxyd.* Die Verträglichkeit ging bis 12 g/kg (2 Ratten).

**2. Versuche an Kaninchen.** 2—3 kg schwere Tiere erhielten die Zinkverbindungen mit Traganthzusatz in 25—50 $cm^3$ Wasser aufgeschwemmt. In den folgenden 4—9 Wochen wurden Körpergewicht, Blutbild und Urin laufend kontrolliert.

*Technisches Zinksulfid.* 3 g/kg wurden von 2 Tieren vertragen. Nach Fütterung von 6 g/kg starben von 3 Tieren 2 nach 7 und 21 Tagen. Das eine Tier hatte Durchfall, das andere eine Pneumonie und histologisch eine schwere diffuse Leberparenchymschädigung. Ein Tier überlebte.

*Sachtolith.* 3 Tiere überlebten 6 g/kg.

*Lithopone „Silbersiegel".* 5 Tiere vertrugen 5 g/kg. Versuche mit 10 g/kg erwiesen sich als schlecht durchführbar, weil es hierbei zu einer Überfüllung des Magens kam.

Zinksulfid ist also als Sachtolith und Lithopone für Ratten und Kaninchen praktisch ungiftig. Auch das technische Zinksulfid ist es für die Ratte, nicht jedoch bei der höchsten Dosis (6 g/kg) für das Kaninchen. Zinkoxyd scheint sich ähnlich wie Zinksulfid zu verhalten.

## IV. Brechwirkung von Zinkchlorid, Zinksulfid, Sachtolith und Lithopone beim Hund.

Die Brechwirkung beim Hund, die die Anwesenheit kleinerer Zinkchloridmengen im Magen zu registrieren erlaubt, liefert einen Beitrag zu der Frage, welche Bedeutung der Lösungsgeschwindigkeit für die toxische Wirkung des Zinksulfids zukommt.

Insgesamt wurden 104 Brechversuche durchgeführt. Hiervon entfielen 91 Versuche auf 6 Hunde in Abständen von 2—3 Tagen, die übrigen auf 4 weitere Hunde. Die Zinkverbindungen wurden in 2%iger Lösung bzw. Aufschwemmung (ohne Traganth) in den nüchternen Magen mit der Schlundsonde verabreicht. Die hohen Dosen der unlöslichen Verbindungen wurden so gegeben, daß die zugeführte Flüssigkeitsmenge niemals 100 $cm^3$ überschritt. Das Gewicht der Hunde lag zwischen 5,5 und 9,1 kg. Jeder Hund erhielt nach Möglichkeit alle Zinkverbindungen in möglichst verschiedenen Dosen mindestens einmal.

Tabelle 6. *Brechwirkung von Zinkchlorid, Zinksulfid, Sachtolith und Lithopone „Silbersiegel" beim Hund.*

| Dosis g/kg | $ZnCl_2$ | technisches ZnS | Sachtolith | Lithopone „Silbersiegel" (Dosis auf ZnS berechnet) |
|---|---|---|---|---|
| 0,01 | + | ⌀ | — | — |
| 0,025 | ++ | ⌀ | — | — |
| 0,05 | ++++ | + | — | — |
| 0,1 | — | ++ | ⌀ | — |
| 0,2 | — | ++ | ⌀ | ⌀ |
| 0,50 | — | +++ | ⌀ | ⌀ |
| 1,0 | — | +++ | ++ | ⌀ |
| 1,8 | — | — | — | + |
| 2,0 | — | ++++ | ++ | — |

Es erbrachen bei: ⌀ kein Tier, + weniger als die Hälfte, ++ die Hälfte, +++ mehr als die Hälfte, ++++ alle Tiere.

Tab. 6 zeigt die Unterschiede in der Brechwirkung zwischen Zinkchlorid, technischem Zinksulfid, Sachtolith und Lithopone, bezogen auf Dosen mit gleichem Zinkgehalt. Die Brechwirkung nimmt in dieser Reihenfolge ab. Der Unterschied zwischen Zinksulfid und Sachtolith läßt nur die Deutung zu, daß eine andere Körnung des Sachtoliths die Lösungsgeschwindigkeit in der Magensalzsäure vermindert. Schwerer zu

deuten ist der Unterschied zwischen Sachtolith und Lithopone. Durch einfache Mischversuche mit Zinksulfid und Bariumsulfat konnten wir diese Frage nicht entscheiden, da sich kein hemmender Einfluß des Bariumsulfats auf die Brechwirkung des Zinksulfids ergab.

## Besprechung der Ergebnisse.

Durch unsere Ergebnisse wird die Bedeutung der resorptiven Komponente der Zinkvergiftung wieder mehr in den Vordergrund gerückt. Nur für hohe Konzentrationen von Zinkchlorid, die allerdings praktisch die Hauptrolle gespielt haben, hat die allgemeine Erfahrung ihre Gültigkeit, wonach die resorptiven Wirkungen hinter den lokalen zurücktreten können.

Die mit verdünnten Lösungen und mit Thiosulfat gewonnene Erkenntnis, daß die Zinkresorption in umgekehrter Proportion zur lokalen Wirkung steht, entspricht bekannten Tatsachen aus der Pharmakologie der Metalle. Da das Thiosulfat zur Therapie der Zinkvergiftung empfohlen wird, dürfte diese Beobachtung im Verein mit der parenteralen Wirkungslosigkeit für die Beurteilung seines antidotarischen Wertes nicht unwichtig sein. Die Festigkeit des Thiosulfat-Zinkkomplexes ist offenbar der des BAL-Komplexes unterlegen.

Die in der Literatur allgemein angenommene geringere Ätzwirkung von Acetat und Sulfat im Vergleich zu Chlorid findet in unseren Versuchen ihre Bestätigung sowohl in den geringeren bzw. fehlenden Lokalbefunden als auch dem stärkeren Hervortreten akut-toxischer Wirkungen. Überraschend ist, daß das Acetat dabei eine Mittelstellung zwischen Chlorid und Sulfat einnimmt.

Übrigens ist die allgemein angenommene Reihenfolge der Ätzwirkung (Chlorid > Sulfat > Acetat) in vitro durch Fällungsversuche an Serumeiweiß nicht nachweisbar. Die zur Ausfällung notwendigen Konzentrationen sind, auf Mol berechnet, bei Chlorid, Acetat und Sulfat gleich. Auch in der Subcutis und im Peritonealraum zeigte sich kein Unterschied bei den hier verwendeten Konzentrationen von 0,5 und 5%.

Wir glauben, daß für die Unterschiede in der Ätzwirkung an der Magenschleimhaut ein unterschiedliches Penetrationsvermögen verantwortlich zu machen ist. Zinkchlorid ist lipoidlöslich[1]. Das Zinkacetat könnte in der undissoziierten Form, in der es zum Teil in der Lösung vorliegt, in die Zelle eindringen. Beide Möglichkeiten kommen dagegen für das Zinksulfat wohl nicht in Betracht.

Der Zinktremor diente uns als gut meßbares Leitsymptom für die stattgefundene Resorption. Wahrscheinlich erfaßte er aber auch den für die akut tödliche Zinkwirkung vielleicht entscheidenden zentralen Faktor. Hierauf deuten auch die histologischen Veränderungen an den

[1] Auch mag bei den hohen Konzentrationen die Bildung eines stark sauren Komplexes (vgl. Hückel) dem Zinkchlorid besondere Eigenschaften verleihen.

Ganglienzellen hin, die Esser bei akut gestorbenen Tieren nachweisen konnte. An anderen Organen (Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz) fanden wir bei 14 untersuchten Tieren, die innerhalb 12 Std nach peroraler Vergiftung gestorben waren, keine histologischen Schädigungen. Bei 4, in einem Zeitraum bis zu 4 Tagen gestorbenen Tieren beobachteten wir jedoch trübe Schwellung der Nieren- und Leberzellen und bei einem weiteren, nach 7 Tagen gestorbenen Tier Leberzellnekrosen. Es handelt sich hier nur um Tiere, die 2—5%ige Lösungen erhalten hatten. Histologische Befunde wurden vermißt nach höheren Konzentrationen, auch wenn der Tod nicht akut eintrat (4 Tiere), ferner auch bei überlebenden Tieren nach 46—85 Tagen (17 Tiere).

Die histologischen Untersuchungen lassen somit ebenfalls den Zusammenhang zwischen Konzentration und Resorption erkennen. Sie zeigen außerdem, daß die Veränderungen an den parenchymatösen Organen nur allmählich sichtbar werden. Sie sind daher auch bei intravenöser Injektion in schwerer Form (Tubulusnekrosen, fettige Leberzelldegeneration) nur aufgetreten, wenn der Tod ausnahmsweise erst nach 3—5 Tagen eintrat, wie dies einmal spontan und zweimal durch Sulfactinbehandlung eintrat.

Aus Zinkoxyd und Zinksulfid können sich unter der Wirkung der Salzsäure im Magen nur Zinkchloridkonzentrationen von weniger als 2% bilden. Für diese kommt nach unseren Befunden eine ernstere Schädigung der Magenschleimhaut nicht in Betracht. Sie reichten nur aus, um eine Brechwirkung zu erzeugen. Dagegen muß gerade bei diesen geringen Konzentrationen mit einer Zinkresorption gerechnet werden. Offenbar ist aber der Umwandlungsprozeß in Zinkchlorid ungenügend, um toxische Mengen entstehen zu lassen. Der begrenzende Faktor liegt, abgesehen von der im Magen vorhandenen Salzsäuremenge, in der ungenügenden Lösungsgeschwindigkeit. Diese wird stark beeinflußt von dem physikalischen Zustande des Zinksulfids, wie aus dem Unterschied zwischen technischem (ungeglühtem) Zinksulfid und dem Sachtolith (geglühtes Zinksulfid) hervorgeht. Aus unseren Versuchen über die Brechwirkung am Hund kann man errechnen, daß etwa 20% des zugeführten technischen Zinksulfids, 2% von Sachtolith und sogar nur 0,5—1% des im Lithopone enthaltenen Zinksulfids in Zinkchlorid umgewandelt werden.

Diese Tatsache ist natürlich auch für die Beurteilung der Gefahren wichtig, die für ein Kind durch Verschlucken des in seinem Tuschkasten enthaltenen weißen Farbsteinchens entstehen könnten. Der Zinksulfidgehalt eines Farbtäfelchens beträgt 0,27 g. Die nach der angegebenen Berechnung hieraus im Magen entstehende Zinkchloridmenge ist praktisch bedeutungslos, selbst wenn man auf Grund der Literatur die tödliche Wirkung von Zinkchlorid beim Menschen höher ansetzt als beim

Tier. Als untere Grenze der tödlichen Dosen werden 3—5 g angegeben. Es wird aber auch berichtet, daß wesentlich höhere Dosen vertragen worden sind.

## Zusammenfassung.

1. Es wird über die tödlichen Dosen und über die lokale Ätzwirkung von Zinkchlorid, -sulfat und -acetat bei peroraler, intravenöser, intraperitonealer und subcutaner Vergiftung von Ratten berichtet.

2. Zwischen lokaler und resorptiver Wirkung bei peroraler Zufuhr besteht ein gewisser Antagonismus, der in einer weitgehenden Unabhängigkeit der letalen Wirkung von der Konzentration, ferner auch in der Wirkung von Thiosulfat und BAL auf die Zinkchloridvergiftung zum Ausdruck kommt.

3. Die toxische Wirkung von Zinkoxyd und -sulfid (einschließlich Sachtolith und Lithopone) wurde an Ratten, Kaninchen und Hunden untersucht und auf die Bedeutung der Lösungsgeschwindigkeit hingewiesen.

## Literatur.

Eichholtz, F.: Handb. d. exp. Pharmakol. Bd. **3**, 3. Teil, S. 1909. — Esser: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **25**, 278 (1935). — Flury u. Zangger: Lehrbuch der Toxikologie, S. 152. Berlin 1928. — Goodman, L., and A. Gilman: The pharmacological Basis of Therapeutics, S. 993. New York 1955. — Hückel, W.: Anorganische Chemie, S. 579. Leipzig 1943. — Lebduska: C. r. Soc. Biol. Paris **102**, 260 (1929). — Patty, F. A.: Industrial Hygiene and Toxicologie, S. 734. New York 1949. — Schwartze and Alsberg: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **21**, 1 (1923). — Starkenstein, Pohl u. Rost: Toxikologie, S. 199. Wien 1929. — Ullmann: Enzyklopädie der technischen Chemie, 2. Aufl., S. 703—707. 1932.

Professor Dr. F. Hahn, Düsseldorf, Pharmakol. Inst. d. Med. Akademie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 435—441 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle).

# Über die blutdrucksteigernde Wirkung von Esteraseblockern (E 605, Eserin und Prostigmin).

Von
K.-W. v. Eickstedt, W.-D. Erdmann und K.-P. Schaefer.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 13. Juni 1955.)*

Bei der Allgemeinvergiftung mit Cholinesterasegiften aus der Reihe der organischen Phosphorsäureester kommt es meist zu einer starken Blutdrucksenkung (Lit. bei Dirnhuber u. Cullumbine 1955). Auch für E 605 („Parathion", Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat) sind von Enders (1952) depressorische Kreislaufwirkungen beschrieben worden. Im Gegensatz hierzu haben wir in früheren Untersuchungen (Erdmann u. Schaefer 1954) bei niedriger Dosierung von E 605 fast ausschließlich blutdrucksteigernde Wirkungen gesehen.

Die Ergebnisse von Enders sind an betäubten Katzen und Hunden mit i.v. Dosen von 10—20 mg/kg E 605 erhalten worden. Erdmann u. Schaefer haben dagegen an decerebrierten Katzen gearbeitet und nur 1 mg/kg E 605 i.v. injiziert.

Auf pressorische Reaktionen nach niederen Dosen mancher Esteraseblocker (Eserin, Prostigmin, HETP, TEPP) wurde auch von anderen Autoren (Salerno u. Coon 1949; Paulet 1954) hingewiesen. So entstand die Frage, ob die unterschiedlichen Kreislaufwirkungen von E 605 auch hier mit den — von Enders und uns verschieden gewählten — Dosierungen oder etwa mit der Narkose in ursächlichem Zusammenhang stehen. Eine direkte experimentelle Prüfung dieser Frage läßt sich jedoch nicht durchführen, weil i.v. Dosen von 10—20 mg/kg E 605 am nicht betäubten (decerebrierten) Tier bereits tödlich wirken. Eine Klärung erschien dagegen indirekt, nämlich durch eine Analyse des Angriffspunktes für den blutdrucksteigernden Effekt von E 605 möglich. Ein gleichzeitig durchgeführter Vergleich mit den Blutdruckwirkungen der bekannten Cholinesterase-Hemmstoffe Eserin und Prostigmin konnte darüberhinaus vielleicht Aufschluß über die allgemeinen Bedingungen des Angriffs (Abhängigkeit von Lipoidlöslichkeit und Ladungscharakter) geben.

## Methodik.

Als Versuchstiere dienten 35 Katzen im Gewicht von 1,5—3,5 kg. Die Tiere wurden in Äthernarkose nach Sherrington decerebriert oder dekapitiert. Anschließend erfolgte künstliche Beatmung. In einigen Versuchen wurden die Katzen

30—120 min nach der Dekapitierung despinalisiert: in erneuter, tiefer Äthernarkose wurde das Rückenmark von der cervikalen Eröffnungsstelle aus mit Hilfe von mehreren Stahldrähten zerstört. Um Blutungen zu vermeiden, wurden die eingeführten Drähte (erhitzt) im Rückenmarkskanal belassen. Der Blutdruck hielt sich dabei im allgemeinen bei 30—40 mm Hg. Die Funktion der peripheren Ganglien (Kontrolle: Blutdrucksteigerung nach i.v. Injektion von 0,05—0,1 mg/kg Nicotin) und die tatsächliche Zerstörung jeder Rückenmarksfunktion (Kontrolle: keine Krampfreaktion nach i.v. Injektion von 0,5 mg/kg Strychnin) wurden bei allen despinalisierten Tieren gegen Versuchsende überprüft. Versuchsbeginn: jeweils mindestens 2 Std nach Beendigung der Inhalationsnarkose.

Registriert wurden der arterielle Blutdruck (Kanüle in der A. carotis comm. sin) und der Druck im rechten Vorhof (mittels eines von der V. jugularis ext. dextra zum Herzen vorgeschobenen Polyäthylenkatheters). Die Registriersysteme waren zur Verhinderung der Blutgerinnung mit Heparin-Ringer-Lösung gefüllt. Injektionen erfolgten in die V. jugularis ext. sin.

Um eine isolierte Wirkung auf die Kreislaufzentren zu erzielen, wurden die zu prüfenden Stoffe auch intraarteriell injiziert. Die Injektionen erfolgten dabei: *an narkotisierten Tieren* (80 mg/kg Chloralose + 250 mg/kg Urethan i.m.) durch einen Polyäthylenschlauch, der von der A. carotis ext. retrograd bis zur Karotidengabelung vorgeschoben war und somit eine Injektion in die A. carotis int. ermöglichte (Carotissinus denerviert), *an decerebrierten Katzen* durch einen Polyäthylenschlauch, der von der rechten A. carotis comm. retrograd vorgeschoben wurde und injizierte Lösungen auf dem Wege über die gleichseitige A. vertebralis zum ZNS gelangen ließ (A. brachialis dextra unterbunden).

Der Wirkstoff E 605[1] wurde in 1%iger alkoholischer Lösung, Eserin (= Physostigmin) als Sulfat und Prostigmin[1] (= Neostigmin) als handelsübliche Ampullenware zur Injektion verwendet. *Alle geprüften Substanzen wurden langsam (30 bis 60 sec) und fraktioniert (alle 4 min 0,1—1,0* mg/kg *i.v.) injiziert.*

## Ergebnisse.

*A. Versuche am decerebrierten Tier.* Die erste i.v. Injektion von 1 mg/kg E 605 (7 Versuche) führt zu kurzfristigem (2 min), starkem Blutdruckanstieg (um etwa 50—60 mmHg). Wiederholte Injektionen der gleichen Dosis lassen diese akute Kreislaufwirkung immer schwächer hervortreten. Dabei pflegt sich der mittlere arterielle Druck auf ein höheres Niveau (um etwa 10—20 mmHg) einzustellen. Nach spätestens 5—6 Einzelinjektionen von je 1 mg/kg E 605 führen weitere E 605-Dosen zur Blutdrucksenkung. Im Stadium der blutdrucksteigernden Wirkung von E 605 verhält sich der Vorhofdruck meist unauffällig. Erst mit hohen Dosen von E 605, die eine stärkere Blutdrucksenkung hervorrufen, kommt es zu einem erheblichen Ansteigen des Vorhofdruckes (bis auf 18—20 cm $H_2O$).

Fraktionierte i.v. Einzelinjektionen von jeweils 1 mg/kg *Eserin (2 Versuche)* oder 0,1 mg/kg *Prostigmin (5 Versuche)* zeigen prinzipiell die gleichen Wirkungen auf Blutdruck und Vorhofdruck, wie sie für E 605 beschrieben wurden. Die pressorischen Reaktionen nach Prostigmin sind

[1] Wir danken den Firmen Bayer und Hoffmann La Roche für die Überlassung von Versuchssubstanzen.

allerdings meist nicht so stark ausgeprägt wie bei den Versuchen mit E 605 und Eserin (hier auch 10mal geringere Dosen!).

*B. Versuche am dekapitierten Tier.* Die nach dem von uns gewählten Injektionsschema durchgeführten Einzelinjektionen von 1 mg/kg E 605 (3 Versuche) lösen auch am dekapitierten Tier noch Blutdrucksteigerungen aus. Diese treten hier allerdings deutlich schwächer als am decerebrierten Tier hervor. Bereits die dritte E 605-Injektion bleibt ohne pressorische Wirkung. Ein kontinuierliches Ansteigen des mittleren

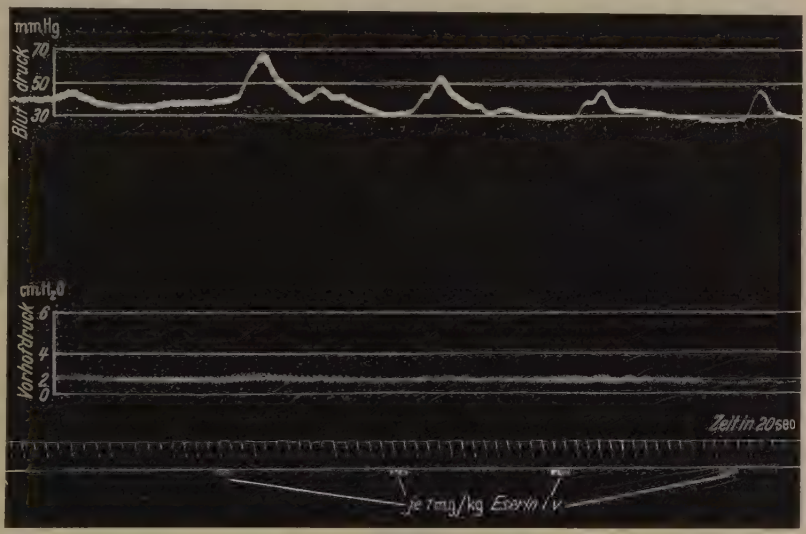



Abb. 1. Auch am despinalisierten Tier (Katze) führen i.v. Injektionen von Eserin (jeweils 1 mg/kg) noch immer zu pressorischen Reaktionen.

arteriellen Druckes kommt im Gegensatz zu den Befunden am decerebrierten Tier nicht vor. Der Venendruck bleibt auch in diesen Versuchen unverändert.

Die durch i.v. Injektionen von jeweils 1 mg/kg *Eserin (3 Versuche)* oder jeweils 0,1 mg/kg *Prostigmin (3 Versuche)* ausgelösten Blutdruckreaktionen sind — in abgeschwächter Form — auch am dekapitierten Tier zu beobachten. Das äußere Bild der Versuche stimmt also auch hier noch weitgehend mit dem der E 605-Versuche überein.

*C. Versuche am despinalisierten Tier.* Mit der gleichen Injektionstechnik, wie sie an decerebrierten und dekapitierten Tieren geübt wurde, lassen sich am despinalisierten Tier durch E 605 (3 Versuche) *keine* Blutdrucksteigerungen mehr auslösen. Schon nach der dritten Injektion (jeweils 1 mg/kg i.v.) kommt es zu bedrohlicher Blutdrucksenkung. Auch mit wiederholten i.v. Einzelinjektionen von jeweils 0,1 mg/kg *Prostigmin*

*(2 Versuche)* können am despinalisierten Tier *keine* pressorischen Wirkungen mehr erzielt werden.

Im Gegensatz zu den mit E 605 und Prostigmin erhaltenen Befunden führen fraktionierte i.v. Injektionen von jeweils 1 mg/kg *Eserin (2 Versuche)* auch am despinalisierten Tier noch immer zu Blutdrucksteigerungen, die sich von den Blutdruckreaktionen am dekapitierten Tier praktisch nicht unterscheiden. Dieser besondere Befund ist in Abb. 1 wiedergegeben.

*D. Versuche mit intraarterieller Injektionstechnik.* Intraarterielle Injektionen von E 605, Eserin oder Prostigmin, durch welche die Wirkstoffe das ZNS auf dem Wege über die A. carotis int. (narkotisierte Tiere) oder über die A. vertebralis (decerebrierte Tiere) erreichen, führen ebenfalls zu kurzfristigen Blutdrucksteigerungen. Diese bleiben — im Gegensatz zu den Befunden bei i.v. Applikation — auch bei wiederholten Injektionen in gleicher Form erhalten. Die für die pressorischen Reaktionen erforderlichen Wirkstoffmengen betrugen hierbei für E 605 0,1 mg/kg, für Eserin 0,1 mg/kg und für Prostigmin 0,05 mg/kg. Derartige Dosen pflegen bei i.v. Injektion noch keine Blutdruckwirkungen hervorzurufen. Durch intraarterielle Injektion von 0,2—0,5 mg/kg Atropin lassen sich die pressorischen Wirkungen nur partiell abschwächen.

## Diskussion.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 1 schematisch zusammengefaßt. Aus der ersten Spalte der Tabelle ist abzulesen, daß E 605, Eserin und Prostigmin bei niedriger Dosierung am decerebrierten Tier

*Tabelle 1.*

| | Ausmaß der blutdrucksteigernden Wirkung am | | |
|---|---|---|---|
| | decerebrierten Tier | dekapitierten Tier | despinalisierten Tier |
| E 605 (1 mg/kg i.v.) | +++ | ++ | ∅ |
| Eserin (1 mg/kg i.v.) | +++ | ++ | ++ |
| Prostigmin (0,1 mg/kg i.v.) | +++ | ++ | ∅ |

eine akute blutdrucksteigernde Wirkung besitzen. Der Angriffspunkt für die pressorische Wirkung ist jedoch offensichtlich nicht nur in den Vasomotorenzentren der Medulla oblongata zu suchen, da auch am dekapitierten Tier noch deutliche blutdrucksteigernde Effekte erhalten bleiben (Spalte 2 der Tabelle). Erst die zusätzliche Entfernung des Rückenmarkes vermag die pressorischen Reaktionen nach i.v. Injektion von E 605 sowie von Prostigmin zu löschen, nicht dagegen die blutdrucksteigernde Wirkung von Eserin (Spalte 3 der Tabelle). Es muß somit geschlossen werden, daß die akute pressorische Wirkung von E 605 und Prostigmin

durch einen Angriff an den bulbären und vor allem spinalen Kreislaufzentren zustandekommt. Damit entfällt für E 605 und Prostigmin die Notwendigkeit einer Diskussion anderer, eine Blutdrucksteigerung bedingender Angriffsmöglichkeiten (z. B. ganglionäre Erregung, direkte Adrenalinausschüttung, direkte Gefäßwirkung u. a.).

Für die pressorische Wirkung von Eserin scheint dagegen neben einer Erregung der bulbären Vasomotorenzentren auch ein peripherer Angriffspunkt verantwortlich zu sein, da auch am despinalisierten Tier noch erhebliche Blutdrucksteigerungen nach Eserin beobachtet werden können. Auf eine nähere Lokalisation dieses peripheren Angriffspunktes von Eserin haben wir verzichtet.

Es sei an dieser Stelle jedoch auf die Untersuchungen von Salerno u. Coon (1949) verwiesen. Danach ist für die Blutdrucksteigerung nach kleinen Dosen von Eserin (und von einigen anderen Esteraseblockern) eine direkte Erregung sympathischer Ganglien verantwortlich zu machen. Dirnhuber u. Cullumbine (1955) nehmen für die pressorische Wirkung von Eserin an der Ratte einen zentralen Angriffspunkt an: die zentrale Erregung soll über das sympathische Nervensystem zu einem Spasmus der Hautgefäße und damit zu einer Blutdrucksteigerung führen. Die Wirkung war durch Enthäutung, aber auch durch ganglionär blockierende Substanzen und Sympaticolytika aufzuheben.

Da die drei geprüften Esteraseblocker E 605, Eserin und Prostigmin fast einheitliche pressorische Wirkungen besitzen, liegt es nahe, für diese Wirkung ihre cholinesterasehemmenden Eigenschaften verantwortlich zu machen. Auf einen gewissen Antagonismus von Atropin wurde in Abschnitt D hingewiesen. Gerade die zentralnervösen Wirkungen von cholinesterasehemmenden Substanzen werden aber sehr verschieden beurteilt (Lit. bei Erdmann u. Schäfer 1954), und die hier vorgelegten Ergebnisse sind nicht geeignet, diese problematische Frage zu klären. Die Einheitlichkeit der zentral ausgelösten Blutdruckwirkung von E 605, Eserin und Prostigmin ist jedoch insofern bemerkenswert, als Prostigmin und Eserin im allgemeinen keine einheitlichen zentralnervösen Wirkungen besitzen, was man auf die verschiedenen Löslichkeitseigenschaften und den verschiedenen Ladungscharakter dieser beiden Substanzen zurückzuführen pflegt (vgl. Herken u. Neubert 1953, weitere Lit. bei Erdmann, Kempe u. Lühning 1955). Gewisse Unterschiede zeigen sich in unseren Versuchen lediglich darin, daß Eserin auch eine peripher angreifende, blutdrucksteigernde Wirkung besitzt, die Prostigmin fehlt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich aber auch E 605 von Eserin, obwohl man erwarten sollte, daß die biologischen Wirkungen dieses Phosphorsäureesters auf Grund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften (Lipoidlöslichkeit, indifferente Ladung) eher denen von Eserin (Lipoidlöslichkeit, indifferente Ladung) als denen von Prostigmin (keine Lipoidlöslichkeit, stark positive Ladung) entsprechen.

Die bei mehrmaliger i.v. Injektion der Esteraseblocker immer schwächer hervortretende pressorische Wirkung ist auch von Salerno u. Coon (1949) beschrieben worden. Es soll sich hierbei nicht um echte tachyphylaktische Wirkungen handeln, sondern um eine Überlagerung durch die muscarinartige Wirkung der cholinesterasehemmenden Substanzen (Salerno u. Coon).

Auch E 605 besitzt nach Enders (1952) blutdrucksenkende Wirkungen muscarinartiger Natur (Atropinantagonismus!)[1]. Es erscheint somit begreiflich, wenn massive Dosen von E 605, wie sie z. B. von Enders verwendet wurden (10—20 mg/kg i.v.[2]), diese muscarinartige Wirkung derart in den Vordergrund treten lassen, daß die vielleicht gleichzeitig die Vasomotorenzentren erregenden Wirkungen überdeckt werden. Die Narkose hat jedenfalls praktisch keinen Einfluß auf den zentral ausgelösten pressorischen Effekt von Esteraseblockern (vgl. Salerno u. Coon).

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß sich die Kreislaufwirkungen von E 605 keineswegs mit den eben genannten Effekten erschöpfen. Neben der bei niedriger Dosierung hervortretenden, die Kreislaufzentren erregenden Wirkung und neben dem erst bei höherer Dosierung deutlichen muscarinartigen Effekt besitzt E 605 in subletalen Dosen auch ausgesprochen herzschädigende Wirkungen (EKG-Veränderungen, Venendruckanstieg; vgl. Enders 1952) und führt schließlich zur tödlichen Lähmung der Kreislauf- (und Atem-) zentren (vgl. Duensing u. Erdmann 1954). Die Bedrohung der lebenswichtigen Zentren ist dabei zweifellos diejenige der vielfältigen Kreislaufwirkungen von E 605, der — im Falle einer Vergiftung — vom Kliniker auch besonders Beachtung geschenkt werden muß.

## Zusammenfassung.

An decerebrierten und dekapitierten Katzen führen i.v. Injektionen von E 605, Eserin oder Prostigmin zu einer akuten Blutdrucksteigerung. An despinalisierten Katzen löst lediglich Eserin, nicht jedoch E 605 und Prostigmin, noch pressorische Reaktionen aus.

Die Befunde sprechen dafür, daß die durch die geprüften cholinesterasehemmenden Substanzen erzielbaren Blutdrucksteigerungen zentralnervös ausgelöst werden. Für Eserin kommt außerdem ein peripherer Angriffspunkt in Betracht.

---

[1] Bei intraarterieller Injektion von E 605 dürfte es daher wohl deswegen nicht zu einer Abschwächung der pressorischen Wirkungen kommen (vgl. unter D), weil die für eine muscarinartige Wirkung erforderlichen Dosen nicht erreicht werden.

[2] Diese Dosen wirken am nicht betäubten Tier bereits tödlich. Daß Narcotica die Letaldosen von E 605 erhöhen, ist von Enders u. Ruf (1952) festgestellt worden.

## Literatur.

Dirnhuber, P., and H. Cullumbine: Brit. J. Pharmacol. **10**, 12 (1955). — Duensing, F., u. W.-D. Erdmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 506 (1954). — Enders, A.: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 169 (1952). — Enders, A., u. H. Ruf: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 174 (1952). — Erdmann, W.-D., u. K.-P. Schaefer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 519 (1954). — Erdmann, W.-D., H.-D. Kempe u. W. Lühning: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 359 (1955). — Herken, H., u. D. Neubert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953). — Paulet, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 157 (1954). — Salerno, P. R., and J. M. Coon: J. of Pharmacol. **95**, 240 (1949).

Dr. K.-W. v. Eickstedt, Dr. W.-D. Erdmann u. Dr. K.-P. Schaefer, Göttingen, Geiststraße 9, Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 442—448 (1955).

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Professor Dr. F. Jung) und dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch.

# Über Stoffwechselleistungen roter Blutkörperchen.

## IV. Substratverarmung und Stoffwechselaktivität.

Von

Hansjürgen Matthies.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 16. Juni 1955.)*

Bei Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Methämoglobinrückbildung und dem Kationentransport in den Erythrocyten[4] hatten wir die Feststellung gemacht, daß der Zeitpunkt der Substratzugabe von großer Bedeutung für die Verwertung der Substrate durch die roten Blutzellen ist. Zugabe von Glucose bewirkt nur zu Beginn der Inkubation der Zellen eine erhebliche Beschleunigung der Reduktionsgeschwindigkeit des Methämoglobins [Hb(3)] und ermöglicht nur dann die Aufrechterhaltung des Kationenbestandes; wurde das Substrat erst ein oder zwei Stunden nach Beginn der Inkubationsperiode zugesetzt, so war die Hb(3)-Rückbildung nur geringfügig beschleunigt und der Kaliumverlust der Zellen nicht mehr aufzuhalten. Im Hinblick auf die Notwendigkeit vergleichender Auswertungen unserer Stoffwechselversuche war es notwendig, diesen Vorgang einer systematischen Untersuchung zu unterziehen, um seine Gesetzmäßigkeiten aufzuklären.

### Methodik.

Kaninchenblut wurde durch Herzpunktion gewonnen, defibriniert und das Plasma durch Zentrifugieren von den Zellen abgetrennt. Das Zentrifugieren dauerte 10 min (bei 3000 U/min). Anschließend wurden die Erythrocyten mit dem gleichen Volumen 2,4%iger $NaNO_2$-Lösung gut durchmischt und 5 min stehen gelassen. durch dreimaliges Waschen wurden die Zellen von den Resten des Oxydationsmittels und den diffusiblen Stoffwechselsubstraten weitestgehend befreit. Die Waschung erfolgte mit einer isotonen Salzlösung, die aus 4 Teilen 0,155 m NaCl und 1 Teil Phosphatpuffer ($p_H$ 7,4) bestand. Dann wurde aus den Zellen mit einer gleichen Salzlösung eine 30%ige Suspension hergestellt. Die Hb(3)-Rückbildung wurde an der CO-Absorption durch das dabei entstehende Hämoglobin [Hb(2)] bei Inkubation um 37° manometrisch gemessen. — Zu verschiedenen Zeiten der Inkubationsperiode erfolgte die Zugabe der Substrate: Glucose $10^{-2}$ m, Glucose $10^{-2}$ m + Methylenblau $5 \cdot 10^{-5}$ m, Fructose $10^{-2}$ m, Natriumlactat $5 \cdot 10^{-3}$ m Formaldehyd $10^{-3}$ m. Die Ausrechnung der Geschwindigkeit der Hb(3)-Rückbildung erfolgte an Hand der Kurven. Da die Anfangskonzentration des Hb(3) bei etwa 90 bis 95%

des Gesamthämoglobins lag, kam sie als Geschwindigkeits-bestimmender Faktor nicht in Betracht. Zur Kontrolle wurden, wie auch in unseren früheren Untersuchungen, in jeder Versuchsreihe colorimetrische Bestimmungen der Hb(3)-Rückbildung durchgeführt, die in allen Fällen die manometrischen Messungen bestätigten.

## Ergebnisse.

Die durch Glucose zu Beginn der Inkubationsperiode erzielbare Beschleunigung der Hb(3)-Rückbildung nimmt um so mehr ab, je später das Substrat zugegeben wird (Abb. 1). Nach etwa 4 Std Inkubation ist durch Glucose nur noch eine eben feststellbare Rückbildungsbeschleunigung zu

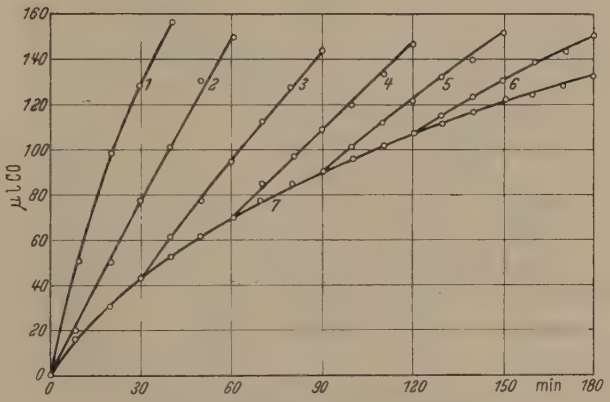



Abb. 1. Hb(3)-Rückbildung durch Glucose.
1: Glucose $10^{-2}$ m vor Versuchsbeginn
2: Glucose $10^{-2}$ m zu Versuchsbeginn
3: Glucose $10^{-2}$ m 30 min nach Versuchsbeginn
4: Glucose $10^{-2}$ m 60 min nach Versuchsbeginn
5: Glucose $10^{-2}$ m 90 min nach Versuchsbeginn
6: Glucose $10^{-2}$ m 120 min nach Versuchsbeginn
7: ohne Substratzusatz.

erreichen. Eine nennenswerte Hämolyse wird in dieser Zeit noch nicht beobachtet. Genau so wie bei Glucose sind auch die Befunde bei Fructose als Substrat. Im gleichen Zeitraum hat auch die „spontane" Rückbildung, die auf nicht diffusible, also nicht auswaschbare Intermediärprodukte der Glucose zurückgeführt wird[3], ständig abgenommen (Abb. 1). — Ist $v_o$ die Rückbildungsgeschwindigkeit nach Substratzugabe bei Beginn der Inkubation, und $v_t$ die Rückbildungsgeschwindigkeit nach Substratzugabe zum Zeitpunkt $t$, so ist die relative Rückbildungsgeschwindigkeit $v_t/v_o$. Trägt man den Logarithmus der relativen Rückbildungsgeschwindigkeit gegen die Zeit $t$ der Substratzugabe in ein Koordinatensystem ein, so ergibt sich ein geradliniger Kurvenverlauf (Abb. 4). Für Glucose und Fructose erhält man auf diese Weise übereinstimmende Geraden. Auch die „spontane" Hb(3)-Rückbildung ergibt das gleiche Bild (Abb. 4).

Nunmehr liegt es nahe, auch die anderen Wege der Hb-(3)Rückbildung auf diese Weise zu untersuchen.

Bekanntlich unterscheidet man hauptsächlich drei verschiedene Möglichkeiten der physiologischen Hb(3)-Reduktion in den kernlosen roten Blutzellen[3, 8, 12]: Mit

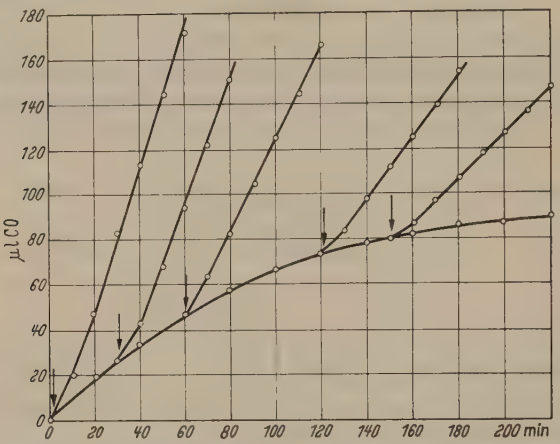



Abb. 2. Hb(3)-Rückbildung durch Glucose und Methylenblau. Glucose $10^{-2}$ m + Methylenblau $5 \cdot 10^{-5}$ m jeweils bei ↓ zugegeben.

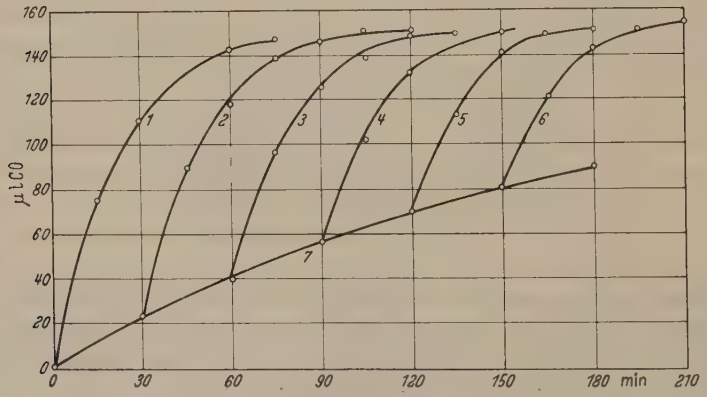



Abb. 3. Hb(3)-Rückbildung durch Lactat.
1: Lactat $5 \cdot 10^{-3}$ zu Versuchsbeginn
2: Lactat $5 \cdot 10^{-3}$ nach 30 min
3: Lactat $5 \cdot 10^{-3}$ nach 60 min
4: Lactat $5 \cdot 10^{-3}$ nach 90 min
5: Lactat $5 \cdot 10^{-3}$ nach 120 min
6: Lactat $5 \cdot 10^{-3}$ nach 150 min
7: ohne Substratzusatz.

Glucose als Substrat (bzw. mit den in den Zellen vorhandenen Hexosephosphaten im Falle der sogenannten „spontanen" Rückbildung) über Phosphoglycerinaldehyd als Wasserstoffdonator, mit Milchsäure als Substrat, die dabei zu Brenztraubensäure oxydiert wird, und schließlich mit Glucose als Substrat über Glucose-6-phosphat

und Phosphogluconsäure. Diese letzte Möglichkeit ist normalerweise für die Hb(3)-Rückbildung von untergeordneter Bedeutung, sie kann aber durch reversible Farbstoffe, wie Thionin oder Methylenblau sehr stark beschleunigt werden und spielt dann eine gewisse Rolle in der Therapie der Methämoglobinämie.

Wir untersuchten zunächst die durch Methylenblau katalysierte Rückbildungsbeschleunigung durch Glucose und kamen dabei zu den

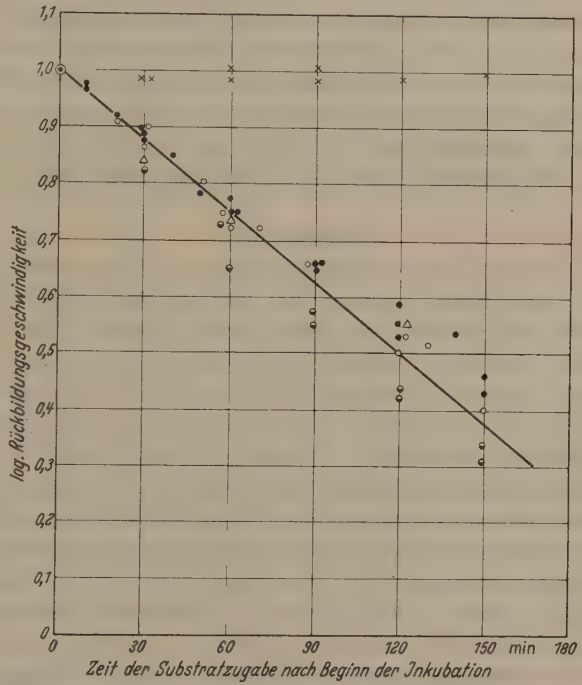



Abb. 4. Abhängigkeit der Hb(3)-Rückbildung vom Zeitpunkt der Substratzugabe. • ohne Substrat. ○ Glucose. △ Fructose. ◒ Glucose + Methylenblau. × Lactat.

gleichen Feststellungen wie bei der Rückbildung durch Glucose allein (Abb. 2). Die Auswertung der Kurven auf die oben beschriebene Weise lieferte ebenfalls wieder Geraden, die im Rahmen der biologischen Streuung die schon gefundene Steigung aufwiesen.

Ein ganz anderes Bild hingegen ergab sich bei Verwendung von Lactat als Substrat. (Abb. 3). Schon auf den ersten Blick war zu sehen, daß diese Reaktion ganz anderen Gesetzmäßigkeiten unterliegt, denn in den von uns untersuchten Zeiten war eine Abnahme der Rückbildungsbeschleunigung nicht festzustellen, und dementsprechend ergab die Auswertung der Versuche mit Lactat eine Gerade, die durch den Wert $t_o$ mit der Steigung 0 geht (Abb. 4).

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die Wirkungsweise der Adstringentien hatten wir dem Formaldehyd besondere Aufmerksamkeit

zugewandt[2, 7, 5], und es hatte sich ergeben, daß diese Substanz eine sehr starke Wirkung auf den Stoffwechsel der roten Blutkörperchen ausübt, die neben ihrer Wirkung auf die Zellstrukturen einhergeht[5]. In der Hoffnung, sowohl für die Aufklärung der hier besprochenen Befunde, als auch für die Vertiefung unserer Vorstellungen über den Mechanismus der Formaldehydwirkung weiteres Material zu gewinnen, setzten wir diesen Stoff zu verschiedenen Zeiten den Erythrocytensuspensionen zu. Auch die Beschleunigung der Hb(3)-Rückbildung durch Formaldehyd war in den von uns untersuchten Zeiten unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe des Aldehyds; sein Verhalten entspricht also dem des Lactats. In Abb. 4 sind die Ergebnisse dieser Arbeit in ein Koordinatensystem eingetragen, wodurch die Unterschiede und Übereinstimmungen deutlich gemacht werden.

## Diskussion.

Für die Deutung dieser Versuche muß man einen fermentativen Prozeß oder einen Faktor suchen, der den zeitabhängigen Reaktionen gemeinsam ist, während er für die Rückbildung durch Lactat der Formaldehyd keine Bedeutung haben dürfte. Die eigentlichen Dehydrierungsfermente sind auszuschließen, da sie im Fall der Rückbildung durch Glucose allein und der durch Methylenblau katalysierten Rückbildung durch Glucose verschieden sind: Im ersten Fall ist es die Triosephosphatdehydrogenase, im zweiten Fall die Gluconsäurephosphatdehydrogenase.

Aus dem gleichen Grund scheiden auch die Co-Fermente aus der weiteren Betrachtung aus: Bei der durch Methylenblau katalysierten Reaktion dient Triphosphopyridinnucleotid, bei der Dehydrierung des Triosephosphats Diphosphopyridinnucleotid als Wasserstoffacceptor. Eine Reaktion ist den zeitabhängigen Rückbildungsarten gemeinsam, und das ist die Phosphorylierung. Da aber für diesen Vorgang bei den einzelnen Substraten gleichfalls verschiedene Enzyme wirksam sind — für die Glucose die Glucokinase und Phosphohexokinase, für Fructose die Fructokinase und Phosphohexokinase, für die durch Methylenblau katalysierte Reaktion nur die Glucokinase, für das nicht auswaschbare Substrat, soweit es sich um Glucose-6-phosphat oder Fructose-6-phosphat handelt, nur die Phosphohexokinase — so bleibt als einziger gemeinsamer Faktor der Phosphatdonator, das Adenosintriphosphat (ATP) übrig. Man kann also annehmen, daß ein zunehmender Mangel an ATP die Ursache der abnehmenden Geschwindigkeit der zeitabhängigen Rückbildungsprozesse ist. Die Ursache für die ATP-Abnahme ist wohl darin zu suchen, daß auf der einen Seite laufend eine Verwertung der energiereichen Phosphatbindung des ATP für die allgemeinen Zelleistungen, wie etwa für den Kationentransport erfolgt[1, 9], daß aber andererseits infolge der Abnahme des nicht auswaschbaren Substrates diese Verluste durch Resynthese nicht mehr ausgeglichen werden können. Wenn man noch einmal

die einzelnen Schritte unserer Überlegungen überblickt, ergibt sich also folgendes Bild: Schwund des „nicht auswaschbaren Substrats", abnehmende Resynthese von ATP bei gleichzeitiger Spaltung, abnehmendes Phosphorylierungsvermögen, verminderte Ausnutzung des Substrats im Falle einer späteren Zugabe, damit wiederum verbundene Unmöglichkeit einer neuerlichen Resynthese von ATP. Es ist also anzunehmen, daß unterhalb eines gewissen ATP-Gehaltes der Zelle der Zusammenbruch des Stoffwechsels nicht mehr aufzuhalten ist. Die Hb(3)-Rückbildung ist gewissermaßen als Indikator für den Substratumsatz aufzufassen.

Paysant und Wolff[6] machten ähnliche Beobachtungen bei der Untersuchung der Glucoseutilisation durch Hb(2)-Zellen in Abhängigkeit von der Glucosezugabe. Sie stellten fest, daß von einem kritischen Zeitpunkt an auch durch Zusatz sehr hoher Substratmengen der Abbau des ATP nicht mehr aufzuhalten ist.

Unsere Auswertung der Versuche erlaubt uns auch, noch einige weitere Angaben zu machen. Offensichtlich liegt den zeitabhängigen Reaktionen ein gemeinsamer Vorgang zugrunde; wenn man unseren Überlegungen folgen will, wäre dies die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion beim Abbau des nicht auswaschbaren Substrates. Aus Abb. 4 läßt sich unmittelbar die Halbwertszeit entnehmen; sie beträgt 72 min. Ließe sich für den Abbau des ATP unter den Bedingungen des Substratmangels eine gleiche Halbwertszeit feststellen, so wäre unsere Vorstellung, daß die Abnahme des ATP in der Zelle die Ursache für die mangelnde Substratverwertung in unserer Versuchsanordnung darstellt, richtig. In der Tat haben orientierende Versuche eine solche Beziehung aufgedeckt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen haben über die eingangs erwähnte Bedeutung für die Aufklärung einiger Differenzen unserer Versuchsergebnisse und die künftige Berücksichtigung bei der Entwicklung methodischer Einzelheiten hinaus Bedeutung für das Problem der Blutkonservierung, bei dem die Erhaltung der Vitalität der Zellen einen entscheidenden Faktor darstellt. Wie wir bereits an anderer Stelle berichteten[4], zeigt sich bei derartigen substratverarmenden, das heißt also mit anderen Worten auch ATP-verarmenden Zellen, ein beschleunigter Kaliumverlust als Vorläufer der Hämolyse. In unseren damaligen Versuchen war dieser Vorgang infolge der gleichzeitig ablaufenden Hb(3)-Rückbildung ebenfalls stark beschleunigt, bei Nichtberücksichtigung der hier erhobenen Befunde mag er aber auch bei nicht so hohem Hb(3)-Gehalt der Zellen eine Rolle spielen.

## Zusammenfassung.

1. Die Beschleunigung der Hb(3)-Rückbildung durch Glucose, Fructose oder durch Glucose und Methylenblau ist vom Zeitpunkt der Zugabe der Substrate nach Einbringen der Zellsuspensionen in den Thermostaten abhängig.

2. Die Beschleunigung der Hb(3)-Rückbildung durch Lactat und Formaldehyd zeigt keine solche Abhängigkeit während der gleichen Zeit.

3. Aus den Befunden wird geschlossen, daß es sich bei dem sogenannten „nicht auswaschbaren Substrat" um die Hexosephosphate handelt.

4. Als Ursache für die abnehmende Ausnutzung der zugesetzten Substrate wird der ATP-Abbau im Zuge allgemeiner Zelleistungen, insbesondere des Kaliumtransports, bei gleichzeitiger Abnahme der Resynthese von ATP angesehen.

## Literatur.

[1] Gardos, G.: Acta physiol. (Budapest) **6**, 191 (1954). — [2] Jung, F., u. K. Onnen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 179 (1955). — [3] Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — [4] Matthies, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 497 (1954). — [5] Matthies, H.: Symposion über Struktur und Funktion der roten Blutkörperchen. Berlin 1955. — [6] Paysant u. Wolff: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1250, 1253 (1952). — [7] Scheler, W., K. Scheler u. F. Jung: Biochem. Z. **326**, 288 (1955). — [8] Spicer, S. S., C. H. Hanna u. A. M. Clark: J. of Biol. Chem. **177**, 217 (1949). — [9] Straub, F. B.: Acta physiol. (Budapest) **4**, 235 (1953). — [10] Warburg, O., F. Kubowitz u. W. Christian: Biochem. Z. **227**, 245 (1931).

Dr. Hansjürgen Matthies, Institut für Pharmakologie u. Toxikologie der Humboldt-Universität Berlin NW 7 Clara-Zetkin-Str. 94.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 449—455 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

# Über schraubenförmige Struktur von Arterien.

## IV. Mitteilung: Pharmakologische Strukturanalyse von Nabelschnurarterien.

Von
R. G. Filippi.

Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 4. Juni 1955.)*

Das Interesse an den Beziehungen zwischen der Wandstruktur eines Blutgefäßes und seiner Funktion führte an den Umbilicalarterien schon mehrfach zu morphologischen Untersuchungen (Lit. zit. bei Henneberg 1902). Demnach haben diese einen „ganz atypischen, besonderen Bau" (Maximow 1948): Auf starke Ringmuskelzüge (Warnecke 1924, Wetzel 1931) folgt innen eine leisten- oder polsterartig (*Valvulae Hobokeni*) in das Lumen vorspringende Längsmuskellage (Spivack 1936, Patzelt 1945), wobei wohlausgebildete elastische Lagen fehlen (Benninghoff 1930) und durch lokale Erweiterung der Arterienwand entstehende knotige Vorwölbungen der Oberfläche (*Noduli Hobokeni*) häufig beobachtet werden. v. Hayek (1935), Goerttler (1950) und Gänshirt (1951) wandten ihre Aufmerksamkeit dem räumlichen Verlauf der Muskelfasern zu und fanden eine schraubenförmige Anordnung.

### Methodik.

Zur Aufklärung der Struktur einer Gefäßmuskulatur eignet sich die Methode von Häusler (1933), die von Pichler, Lazarini u. Filippi (1953) an den Kopfarterien und von Häusler u. Filippi (1954) an den Coronarien angewendet wurde: in Kettenform aneinandergereihte Arterienringe bzw. Wandstreifen, die in Form von Schraubenlinien mit verschiedener Steighöhe aus dem Gefäßrohr geschnitten werden, bzw. intakte und aufgeschnittene Längspräparate werden im Wasserbad aufgehängt und ihr Verhalten unter Zugabe eines Testmittels registriert. Aus dem „Kräfteparallelogramm" der Kontraktion bzw. Erschlaffung kann man Rückschlüsse auf die strukturelle Anordnung der Muskelfasern in der Gefäßwand ableiten (Abb. 1).

Sofort nach Abnabelung des Neugeborenen oder nach der Geburt der Placenta wurde ein möglichst langes Stück der Nabelschnur steril abgesetzt, in sauerstoffgesättigte Tyrode verbracht und aufbewahrt, wo bei + 4° C sich die Arterien bis zu 10 Tage reaktionsfähig erhielten. Zwischen diesen und solchen, die sofort in körperwarmer Tyrode zum Versuch gelangten, ergab sich kein Unterschied.

Der Durchmesser der Gefäße bei der Präparation, wo sie maximal kontrahiert waren, betrug durchschnittlich 0,5—1,0 mm, nach Aushängen im Wasserbad durchschnittlich 3,0 mm; bei Verwendung von Arterienringen mußten dementsprechend

50—1 Ringe aneinandergereiht werden, um eine Streifenlänge von etwa 15 mm zu erhalten. Dies gilt unter der Voraussetzung, daß die Gefäßmuskulatur in allen Verlaufsrichtungen gleichmäßig kontrahiert war. Schraubige Wandstreifen wurden entweder mit einer feinen Schere unter Rotation des Gefäßröhrchens oder, nach Aufziehen auf eine Nähnadel, mit einer Rasierklinge unter Drehung geschnitten.

Das 50 ml fassende Wasserbad wurde mit Luft oder Sauerstoff + 5% Kohlendioxyd durchperlt, da die Gefäße so am ehesten eine mittlere Tonuslage einnahmen. Die Temperatur betrug 37,0° C. Die Schreibhebel wurden durchschnittlich mit 0,1 g belastet. Die Zeit zwischen Auswaschen und einem neuen Zusatz betrug oft

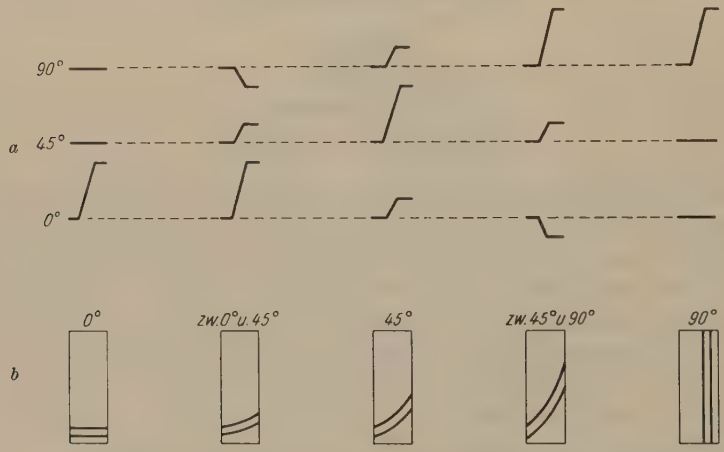



Abb. 1. a) Reaktionen der Gefäßbreiten auf eine kontrahierende Substanz bei einem Schnittwinkel von 90°, 45° und 0°. b) Muskelfaseranordnung im Gefäß.

½ Std, da die Präparate meistens solange brauchten, um zu erschlaffen. Dies könnte durch den Mangel elastischer Elemente (Maximow 1948) bedingt sein. Die Gefäße reagierten noch bis zu 12 Std nach dem Einhängen.

Zum Unterschied von den bisher untersuchten Gefäßgebieten traten hier keine Spontankontraktionen auf.

## Ergebnisse.

Die hier verwerteten Versuche wurden mit Arterien durchgeführt, die dem kindsnahen Drittel der Nabelschnur entstammten, da Vorversuche mit anderen Abschnitten weder im strukturellen (wie bei v. Hayek, 1936) noch pharmakologischen Verhalten Unterschiede aufzeigten. Ebenso ergaben in Übereinstimmung mit Shordania (1929) vergleichende Untersuchungen der gewunden und gestreckt verlaufenden Gefäßabschnitte keine Unterschiede des Wandbaues.

Das Lumen der Gefäße bot bei der Präparation stark wechselnde Querschnittsbilder: Es folgten aufeinander stark kontrahierte, blutleere, sowie dilatierte — mit Blut strotzend gefüllte Abschnitte. So ist auch die Gefäßwand bald hauchdünn — an diesen, als „noduli Hobokeni" beschriebenen, varikösen Erweiterungen der Gefäße glückten keine

Versuche, da die Arterienwand der Präparation nicht standhielt — bald mächtig verdickt und verschließt das Lumen völlig.

*Strukturanalyse.* In den vorangehenden Mitteilungen wurden die für die Beurteilung der Gefäßstruktur maßgebenden Gesichtspunkte abgehandelt. Zur groben Orientierung diene hier folgende Tabelle:

Zur Prüfung auf Kontraktion wurde Histamin verwendet, da aus dessen Wirkung auf die Menge der kontraktilen Muskelelemente des betreffenden Gefäßstreifenpräparates geschlossen werden kann (Feldberg u. Schilf, 1930).

Die Untersuchung auf Ringmuskulatur konnte wegen des geringen Durchmessers der Gefäße nur an intakten Ringketten, deren Einzelring mindestens 1 mm breit war, erfolgen. Wie schon Runge und Mitarb. (1929) konnten auch wir keine ringförmig angeordneten Fasern nachweisen (Abb. 2). Ja es kam vereinzelt zu „paradoxer" Erschlaffung der Ringe, bei gleichzeitiger Verkürzung des steilschraubig geschnittenen Streifens. Nur ganz vereinzelt konnten schwache Kontraktionen der Ringe beobachtet werden, was darauf zu beruhen scheint, daß bei der zum Durchmesser relativ großen Breite der Ringe flachschraubig verlaufende Muskelfasern miterfaßt wurden.

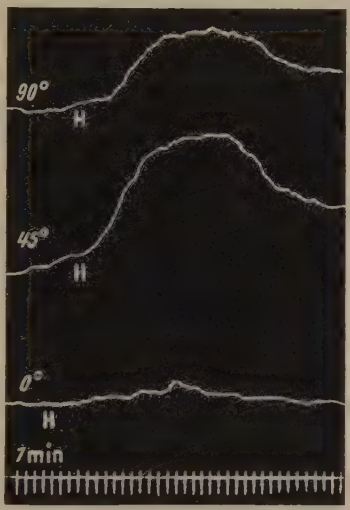



Abb. 2. Art. umbilicalis vom Menschen, 8 Std post partum, Durchmesser 1,5 mm, Temp. 37,5° C, Luft durchperlt. Bei H: Zusatz von 0,1 γg/ml Histamin. Schraubenstruktur.

Schraubenförmig angeordnete Muskulatur ist am stärksten vertreten. Die kräftigsten Kontraktionen überhaupt zeigten Schraubenstreifen von 45° Steigungswinkel, jedoch kontrahierten sich auch solche von 30° und 60° ausgiebig und daneben noch alle Präparate, die einen schraubenförmigen Faserverlauf von etwa 15° bis gegen 90° wiedergeben. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß die Schraubentouren verschieden steil verlaufen und, da die Kontraktionen sowohl bei links- als auch rechtsgängiger Schnittführung gleich stark waren, scherenförmig angeordnet sind.

Bei der Prüfung auf Längsmuskulatur konnte diese u. a. auch schon von Runge und Mitarb. (1929) sicher nachgewiesen werden, wenngleich sie nicht so mächtig ausgebildet zu sein scheint wie die schraubenförmige. Auch hier ist, ähnlich wie bei den Ringen, für die sehr flach verlaufenden Fasern in Erwägung zu ziehen, daß bei der Kleinheit der Streifen, sehr steil, aber doch schraubig verlaufende Fasern als Längsmuskulatur in Erscheinung treten könnten.

Intakte Gefäß-Längsstücke reagierten nur sehr gering, wie es ja bei der Vielzahl der widerstrebenden Faseranordnungen und deren gegenseitiger Verflechtung nicht anders zu erwarten war.

*Pharmakologisches Verhalten.* Die Ergebnisse mit Pharmaka sind in der Tab. 1 zusammengefaßt. *Histamin* kontrahiert am kräftigsten, schon

*Tabelle 1.*

| Substanz | Konzentration in µg/ml | Wirkung + Kontraktion — Erschlaffung 0 ohne Erfolg |
|---|---|---|
| Histamin. dihydrochloricum | 0,1 | +++ |
| Histamin nach vorherigem Neoantergan (0,1 µg/ml) | 0,1 | 0 |
| Neoantergan (N-a-Pyr) | 0,1 | 0 |
| Adrenalin. bitartaricum | 1,0 | ++++ |
| Adrenalin nach vorherigem Ergotamin (6,6 µg/ml) | 1,0 | — |
| l-Noradrenalin. bitartaricum | 10,0 | + |
| Cocain. hydrochloricum | 1,0 | 0 |
| Ergotamin. tartaricum | 6,6 | + |
| Acetylcholinchlorid crist. | 1,0 | ++ |
| Atropin. sulfuricum | 1,0 | 0 |
| Physostigmin. sulfuricum | 1,0 | 0 |
| DHE (Dihydroergotamin-methansulfonat) | 6,6 | (+) |
| Hydergin | 6,0 | 0 |
| Hypophysenhinterlappen-Extrakt „Pituin", Rieswerke-Graz | 4 I.E. | + |
| Coffein.-Natr. benzoicum | 10,0 | (+) |
| $BaCl_2$ | 1,0 | +++ |
| Papaverin. hydrochloricum | 1,0 | ——— |
| Amylium nitrosum | 1,0 | —— |
| Natrium lacticum | 10,0 | — |
| Sauerstoff 100% | | +++ |
| Sauerstoff 99% + Kohlendioxyd 1% | | + |
| Sauerstoff 90% + Kohlendioxyd 10% | | — |
| Kohlendioxyd 100% | | ——— |
| Stickstoff 100% | | —— |
| Abkühlung auf 20° C | | +++ |
| Erwärmung auf 40° C | | — |

bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml Badflüssigkeit. Die Kontraktion setzt rasch ein und ist schnell auswaschbar. Durch *Neoantergan*, das selbst keine Wirkung zeigt, läßt sich diese erwartungsgemäß unterdrücken. *Adrenalin* wirkt ebenfalls stark kontrahierend, sicher erst ab 1,0 µg/ml. Die Verkürzung erfolgt träger und geht langsamer zurück. *Noradrenalin* 10,0 µg/ml bewirkt eine langsame und anhaltende Kontraktion. *Cocain* 1,0 µg/ml ist unwirksam. 6,6 µg/ml *Ergotamin* und höhere Dosen haben manchmal eine mäßige Kontraktion zur Folge. Es hebt den kontrahierenden Effekt nachfolgend zugesetzten 1 µg/ml Adrenalins sicher auf,

wobei sich gelegentlich nach Adrenalin sogar eine Erschlaffung zeigt. Auf Noradrenalin wirkt es hingegen nicht. 1 $\mu$g/ml *Acetylcholin* kontrahiert stark.

Diese Befunde stehen nur bezüglich Histamin im Einklang mit den angioplethysmographischen Untersuchungen von Smith (1951). Adrenalin, Noradrenalin und Acetylcholin waren in seinen Versuchen unwirksam. Bei dieser Methode wird das Gefäßstück in seiner Längsrichtung fixiert. Hierdurch scheint die für die volle Funktionstüchtigkeit der Schraubenmuskulatur von Goerttler (1950) und Gänshirt (1951) geforderte freie Verkürzungs- oder Verlängerungsmöglichkeit nicht gegeben und nur das am energischsten kontrahierende Histamin wirksam sein zu können.

Euler (1938) fand bei Perfusion der Placenta von den Umbilicalarterien aus Adrenalin und $BaCl_2$ stark, Acetylcholin, Ergotoxin und HHL-Extrakt schwach verengend; Ergotoxin hob die Adrenalinwirkung auf. Acetylcholin wirkte unsicher, aber eher dilatatorisch. Die Ergebnisse von Runge u. Mitarb. (1928) an Arterienringen und Längsstreifen stehen mit unseren im Einklang.

*DHE* in der Konz. von 6,6 $\mu$g/ml zeigt angedeutete Verkürzung des Längsstreifens. *HHL-Extrakt* (4 I. E.) und 10 $\mu$g/ml *Coffein* wirken schwach kontrahierend. Hingegen kontrahiert *$BaCl_2$* stark.

Eine Reihung nach der Konz. ihrer Wirksamkeit ergibt etwa folgendes:

Histamin $>$ Adrenalin $>$ Acetylcholin $>$ Noradrenalin $>$ $BaCl_2$ $>$ Ergotamin $>$ Coffein $>$ DHE $>$ HHL-Extrakt. Erschlaffend wirkten in ebensolcher Reihenfolge genannt: Papaverin $>$ Amylnitrit $>$ milchsaures Natrium. Unwirksam waren: Atropin, Cocain, Eserin, Hydergin.

Von besonderem Interesse waren die Ergebnisse bei Einwirkung von Sauerstoff und Kohlendioxyd. Durchperlen von Luft oder besser einem Gemisch von 95% $O_2$ und 5% $CO_2$ gewährleistet eine mittlere Tonuslage der Gefäße. $O_2$ kontrahiert, $CO_2$ erschlafft. Die $O_2$ Wirkung steht im Gegensatz zum Verhalten der bisher untersuchten Arterien, wo unter $O_2$ höchstens eine stetige Tonuszunahme eintrat. Ein Gemisch von 1% $CO_2$ mit 99% $O_2$ wirkt noch leicht kontrahierend, umgekehrt ein solches von 10% $CO_2$ mit 90% $O_2$ schon erschlaffend. Durchperlen von $N_2$ führt zu Erschlaffung.

Schließlich kommt es bei Abkühlung von 35° C abwärts zu immer stärkerer Kontraktion, während Erwärmung bis auf 45° C erschlaffend wirkt.

## Besprechung der Ergebnisse.

Die erhobenen Befunde gestatten folgende Feststellungen zu treffen: Die durch histologische Untersuchung ermittelte Anordnung der Muskelfasern der Umbilicalarterien (v. Hayek 1936, Goerttler 1950, Gänshirt 1951) konnte auch funktionell nachgewiesen werden.

Diese schraubige Gefäßmuskulatur zeichnet sich durch eine relativ große Kontraktilität und Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Pharmaka aus.

Die Frage nach der besonderen Bedeutung dieser Verhältnisse sei hier berührt; haben doch die Umbilicalarterien die Aufgabe zu erfüllen, der Placenta eine genügende Blutmenge zum Stoff- und Gasaustausch auch unter erschwerten Bedingungen des intrauterinen Lebens zur Verfügung zu stellen, etwa bei Quetschung, Zerrung, Drehung oder Verschlingung der Nabelschnur. Daß sie diesen Anforderungen optimal gerecht zu werden vermögen, was ja die geburtshilfliche Praxis bestätigt, läßt sich tatsächlich aus den Gegebenheiten ihres Wandbaues erklären. Bei den mit ungleich kräftigerer Muskulatur als die Coronarien ausgestatteten Nabelschnurarterien dürfte demnach die bereits dort diskutierte Bedeutung für die Erhaltung der Gefäßstatik gegenüber äußeren Einflüssen eine der Hauptaufgaben der Wandstruktur sein.

Die Schraubenstruktur einer Gefäßwand befähigt diese nach v. Hayek (1936) bei gleicher relativer Verkürzung der Muskelfasern, die bei zirkulärer Anordnung nur eine minimale Lumenverengung bewirken würde, einen Verschluß desselben herbeizuführen. Andererseits konnten Goerttler (1950), Gänshirt (1951) sowie Pichler, Lazarini und Filippi (1953) an der Art. basalis des Menschen zeigen, daß die Kontraktion steilschraubiger (über 45°) Fasern unter bestimmten Voraussetzungen eine paradoxe Erweiterung des Lumens bewirken kann. Diese Feststellung könnte für unsere Befunde zutreffen, bei denen es zur Erschlaffung der Arterienringe bei gleichzeitiger Verkürzung des 45°- und Längsstreifens kam. Die Möglichkeit einer Mitbeteiligung der Gefäßmuskulatur an den Blutverschiebungen zwischen Kind und Placenta (Haselhorst 1929) liegt daher auf der Hand. Gestützt wird eine solche Annahme durch das Verhalten der Wandmuskulatur gegenüber Sauerstoff (Schmitt 1922 und 1923, Rech 1925, Runge 1927, Haselhorst 1929, Cattaneo 1935) Abkühlung (Henneberg 1902), die kontrahierend einwirken. Offenbar wirken bei dem postnatalen Gefäßverschluß verschiedene Faktoren, wie Änderung der Sauerstoffspannung, Abkühlung und mechanische Einflüsse zusammen. Gerade dies dürfte den hohen Sicherheitsgrad für das Funktionieren des Gefäßverschlusses bedingen.

## Zusammenfassung.

Mit der Gefäßstreifenmethode nach Häusler wurde die Wandstruktur der Nabelschnurarterien ermittelt. Hierzu wurden nebeneinander Ketten von Gefäßringen, schraubenförmig geschnittene Streifen und Längsstreifen unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka verglichen.

Die Gefäßmuskulatur setzt sich aus kontraktilen Elementen zusammen, die in einem Bereich von 0° bis fast 90° Steigwinkel in Form rechts- und linksgängiger Schrauben, also scherenförmig verlaufen. Die kräftigsten Kontraktionen zeigen Schraubenstreifen von etwa 45° Steigwinkel.

Bei der Prüfung von Pharmaka zeigten sich die Nabelschnurarterien vor allem empfindlich gegenüber Histamin, Adrenalin und Acetylcholin.

Die Hauptaufgabe der so beschaffenen Wandstruktur wird in der Erhaltung der Gefäßstatik gegenüber äußeren Einflüssen gesehen.

## Literatur.

Benninghoff, A.: Handbuch der mikroskop. Anat. **6**, I. Teil, 103, Berlin: Springer 1930. — Cattaneo, L.: Ann. Ostetr. ginec. **57**, 319 (1935). — v. Euler, U. S.: J. of Physiol. **93**, 129 (1938). — Feldberg, W., u. E. Schilf: Histamin, Monogr. aus d. Ges.-Gebiet d. Physiologie, 20. Bd., Berlin: Springer 1930. — Gänshirt, H.: Morph. Jb., Leipzig **90**, 59 (1951). — Goerttler, K.: Anat. Nachr. Stuttgart **1**, 4—8, 73 (1950). — Haselhorst, G.: Z. Geburtsh. **96**, 487 (1929); **95**, 32 u. 224 (1929). — Häusler, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **172**, 302 (1933). — Häusler, H. F., u. R. G. Filippi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 187 (1954). — v. Hayek, H.: Z. Anat. **105**, 15 (1936). — Henneberg, B.: Anat. Hefte, Wiesbaden **19**, 524 (1902). — Maximow, A., and W. Bloom: A Textbook of Histology, 5. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1948. — Patzelt, V.: Histologie, 1. Aufl., Wien: Urban u. Schwarzenberg 1945. — Pichler, E., W. Lazarini u. R. G. Filippi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 420 (1953). — Rech, W.: Z. Biol. **82**, 487 (1925). — Runge, H.: Zbl. Gynäk. **51**, 46 (1927). — Runge, H., M. Bauer u. H. Hartmann: Arch. Gynäk. **136**, 319 (1929). — Schmitt, W.: Jber. Gynäk. **36**, 580 (1922). — Z. Biol. **79**, 45 (1923). — Shordania, J.: Anat. Anz. **90**, 696 (1939). — Smith, D. J.: Amer. J. Physiol. **164**, 86 (1951). — Spivack, M.: Anat. Rec. **66**, 127 (1936). — Warnecke, W.: Arch. Tierheilk. **51**, 525 (1924). — Wetzel, K.: zit. nach v. Hayek.

Dr. R. G. Filippi, Pharmakologisches Institut der Universität Graz, Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 456—459 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

# Nachweis von 5-Oxytryptamin im Harn.

Von

F. Lembeck und K. Neuhold.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 4. Juni 1955.)*

Udenfriend, Titus u. Weissbach (1955) wiesen das Abbauprodukt des 5-Oxytryptamins (OTr), die Oxyindolessigsäure (OIE) im Harn nach. Twarog u. Page (1953) gaben nach Untersuchungen am Herz der Venus mercenaria die OTr-Ausscheidung des Menschen in 9 untersuchten Fällen mit 0,045 bis 0,45 $\mu$g/ml Harn an. Die vorliegende Untersuchung gilt der praktischen Anwendung einer im Institut entwickelten spezifischen Methode zur quantitativen Bestimmung von OTr im Harn, wobei die Ausscheidung eines Carcinoidträgers mit der von gesunden Personen verglichen wurde, was im Hinblick auf den hohen OTr-Gehalt von Carcinoiden bzw. deren Metastasen von Interesse ist (Lembeck 1954, Ratzenhofer u. Lembeck 1954, Hornykiewicz 1955, Meyers 1955).

## Methodik.

2mal 20 ml einer Harnprobe werden in je 2 Abdampfschalen gebracht. Einer dieser Proben (B) wird 1 $\mu$g/ml OTr zugesetzt. Beide Proben werden mit n-HCl auf $p_H$ 3—4 gebracht, im Stickstoffstrom auf dem kochenden Wasserbad auf 5 ml eingeengt und in je ein 20 ml-Zentrifugenglas geleert. Daraufhin werden jeweils etwa 2 g Kochsalz, also mindestens so viel, daß ein kleiner Rest ungelöst bleibt, zugegeben. Dann wird mehrmals mit 10 ml wasserfreiem Aceton ausgeschüttelt, so lange, bis nur mehr ein trockener Niederschlag bleibt, der verworfen wird. Der Acetonextrakt wird etwa 6 Std auf —10° C abgekühlt, wobei Salz ausfällt. Nach Abzentrifugieren wird das Aceton am kochenden Wasserbad im Stickstoffstrom verjagt. Der Rückstand wird in 1 ml destilliertem Wasser gelöst.

Dieser Extrakt wird papierchromatographiert (Papier Macherey & Nagel Nr. 214, Isopropanol : Wasser = 1:1, 15—18 Std), wobei folgendermaßen aufgetragen wird (Abb. 1):

Nach Abtrocknen wird das Chromatogramm in 3 Teile zerschnitten ( ↓ ).

Der Teil C, auf welchem Serotonin zur Kontrolle punktförmig aufgetragen worden war, wird zum Sichtbarmachen von OTr mit Diazoreagens besprüht. Eine Kontrolle mit „OTr + Harnextrakt A“ auf dem Streifen C ist nötig, weil ihr $R_f$-Wert anders ist als der einer reinen OTr-Lösung.

Auf den Streifen A und B werden die dem OTr entsprechenden, im Streifen C festgestellten Querstreifen angezeichnet und dann herausgeschnitten. Diese Streifen

werden eluiert (Methode nach CRAWFORD u. OUTSCHOORN 1951) und die Eluate (je 2 ml) am Rattenuterus (GADDUM, PEART u. VOGT 1949) mit Oxytryptamin verglichen.

Bei der Einengung und Acetonextraktion ergaben sich nur geringe, bei der Chromatographie und der darauffolgenden Elution verschieden starke Verluste. Aus dem Gehalt pro Milliliter des normalen Harnes ($A$) und dem Gehalt pro Milliliter des mit OTr versetzten Kontrollharnes ($B$) wird die richtige OTr-Menge ($X$) mit Hilfe der bekannten pro Milliliter zugesetzten Menge ($b$) nach der folgenden Formel berechnet:

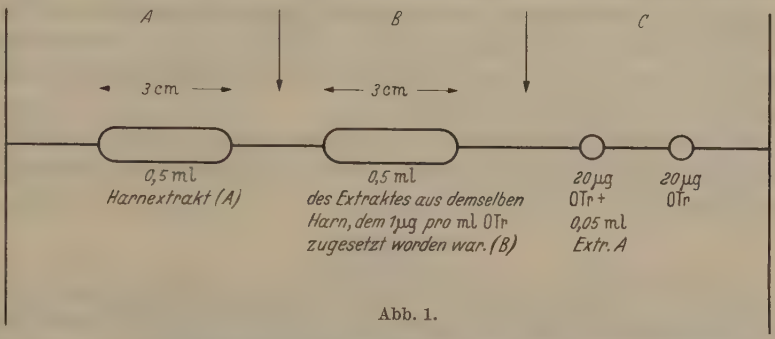



Abb. 1.

$$X = b \frac{A}{B - A}.$$

## Ergebnisse.

Es wurde der Morgenharn von gesunden Versuchspersonen und der Harn eines Carcinoid-Patienten untersucht[1]. Der Harn der gesunden Versuchspersonen (Nr. 1—9) wurde am gleichen Tage extrahiert.

*Tabelle 1.*

| Nr. | Versuchsperson | Geschlecht | Alter | OTr-Gehalt des Harnes µg/ml. |
|---|---|---|---|---|
| 1 | F. L. | männl. | 33 | 0,014 |
| 2 | H. K. | männl. | 31 | 0,72 |
| 3 | R. S. | männl. | 27 | 0,32 |
| 4 | O. E. | männl. | 25 | 0,19 |
| 5 | K. N. I. | männl. | 27 | 0,08 |
| 6 | I. E. | weibl. | 56 | 0,04 |
| 7 | K. N. | weibl. | 50 | 0,038 |
| 8 | K. N. II. | männl. | 52 | 0,05 |
| 9 | K. N. I. | männl. | 27 | 0,045 |
| 10 | J. S. | männl. | 47 | 3,12 |
| 11 | J. S. | männl. | 47 | 2,5 |
| 12 | J. S. | männl. | 47 | 3,45 |

[1] Die Überlassung dieses Harnes verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Doz. Dr. HEGGLIN, Chefarzt der inneren Abteilung des Kantonsspitals St. Gallen.

Der Harn des Carcinoid-Patienten wurde nach Entnahme (28. 2. 1955) mit HCl auf $p_H$ 3—4 gebracht, mit der gleichen Menge Aceton versetzt und kam nach 4 Tagen (Nr. 10) bzw. 14 Tagen (Nr. 11) zur Extraktion. Bei der Bestimmung Nr. 10 betrug der Gehalt 3,12 $\mu$g/ml, im selben Harn 10 Tage später 2,5 $\mu$g/ml, woraus ein gewisser Verlust bei längerer Lagerung zu erkennen ist. Eine zweite Portion (entnommen am 25. 3. 1955) kam ebenfalls 4 Tage nach der Entnahme zur Untersuchung (Nr. 12). Vor der Extraktion wurde das Aceton im Stickstoffstrom verjagt und dann wie üblich extrahiert.

Die Ergebnisse sind aus Tab. 1 zu ersehen. Bei normalen Personen fanden wir 0,014 bis 0,72 $\mu$g/ml OTr. Bei dem Carcinoidträger jedoch 3,12 bis 3,45 $\mu$g/ml.

## Diskussion.

Die ersten Angaben einer OTr-Ausscheidung im Harn stammen von Twarog u. Page (1953). Sie wurden durch Austestung des unvorbehandelten Harnes am Herz der Venus mercenaria ermittelt, welches große Empfindlichkeit für OTr zeigt und gegen andere bekannte biogene Amine ziemlich unempfindlich ist.

Die Austestung unvorbehandelten Harnes am Rattenuterus hätte bei diesem OTr-Gehalt gerade noch möglich sein müssen, stieß aber auf Schwierigkeiten. Es zeigte sich nämlich, daß im Harn mit zugesetztem OTr eine Hemmung seiner Kontraktionen am Rattenuterus zu beobachten ist. Eine Einengung des Harnes auf ein Zehntel seines Volumens erwies sich wegen Störung der Austestung durch Salze u. dgl. als unbrauchbar. Die Extraktion von OTr aus dem Harn gelang wohl mittels Adsorption an Kohle, Magnesium-Trisilikat und Aluminiumhydroxyd bei alkalischer Reaktion, doch brachten die Elutionsversuche kein brauchbares Ergebnis. Erst mittels der beschriebenen Acetonextraktion war eine Trennung von störenden Substanzen und Konzentrierung möglich.

OTr wird durch die Aminooxydase zu Oxyindolessigsäure abgebaut. Von Udenfriend und Mitarb. wurde OIE im Harn nachgewiesen. Bei gesunden Versuchspersonen wurden 2,0 bis 8,2 mg pro die, bei 2 Carcinoidfällen 142,0 und 384,0 mg pro die OIE gefunden. Auch beim hier genannten Carcinoidfall fand Langemann 0,9 bis 1,5 mg/ml bzw. wir 1,0 bis 2,4 mg/ml OIE (entsprechend 700—1680 mg OIE pro die). Diese Relation der OTr- zur OIE-Ausscheidung zeigt, daß im Falle einer enorm erhöhten OTr-Produktion durch Carcinoide wohl eine gewisse Erhöhung der OTr-Ausscheidung zu finden ist, daß aber im wesentlichen auch in diesen pathologischen Fällen ein sehr rascher Abbau des OTr einsetzt. Als Maß für diese OTr-Bildung kann daher viel eher die OIE-Ausscheidung als die OTr-Ausscheidung gelten. Gerade im hier untersuchten Falle betrug die OIE-Ausscheidung pro Tag über 700 mg, was auf die Bildung einer mindestens ebenso großen Menge von OTr schließen läßt. Die Harnausscheidung von OTr war verglichen mit dieser hohen OIE-Ausscheidung

nicht so besonders stark erhöht. Dies entspricht auch experimentellen Versuchen, die zeigten, daß injiziertes OTr im Harn zu einem großen Teil als OIE ausgeschieden wird (Erspamer 1955).

## Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zum Nachweis von Oxytryptamin im Harn angegeben.

Der Morgenharn gesunder Versuchspersonen enthielt 0,014 bis 0,72 $\mu$g/ml Oxytryptamin. Der Harn eines Carcinoidträgers 3,12 bis 3,45 $\mu$g/ml.

Der Vergleich der Ausscheidung von Oxytryptamin und von Oxyindolessigsäure zeigt, daß nur ein sehr kleiner Teil des im Körper gebildeten Oxytryptamin unverändert im Harn ausgeschieden wird.

## Literatur.

Crawford, T. B. B., and A. S. Outschoorn: Brit. J. Pharmacol. **6**, 8 (1951). — Erspamer, V.: Pharmacol. Rev. **6**, 425 (1954). — Gaddum, J. H., W. S. Peart and M. Vogt: J. of Physiol. **119**, 363 (1949). — Hornykiewicz, O.: persönliche Mitteilung. — Langemann, H.: persönliche Mitteilung. — Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 50 (1954). — Meyers, F. M.: persönliche Mitteilung. — Ratzenhofer, M., u. F. Lembeck: Z. Krebsforschg. **60**, 169 (1954). — Twarog, B. M., and J. H. Page: Amer. J. Physiol. **175**, 157 (1953). — Udenfriend, S., E. O. Titus and H. H. Weissbach: J. of Biol. Chem. 1955, im Druck.

Doz. Dr. F. Lembeck, Graz/Österreich, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 460—466 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn).

# Über den Einfluß der Ganglienblockade auf die Blutdruckwirkung zentraler Analeptika.

Von

H. Giertz, F. Hahn und W. Rummel.

Mit 5 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 17. Mai 1955.)*

Die Frage, ob Ganglienblocker die Blutdruckwirkungen zentraler Analeptica zu hemmen vermögen, ist zuerst von Serin geprüft worden. Er fand keinen Einfluß von Hexamethonium auf Coramin (Nicotinsäurediäthylamid) an Katzen und Kaninchen in Urethannarkose. Nach Bein u. Meier wird sogar die bludrucksteigernde Coraminwirkung durch Pendiomid (N, N, N′, N′-3-Pentamethyl-N, N′-diäthyl-3-azapentylen-(1,5)-diammoniumdibromid) an Katzen in Dial-Urethannarkose verstärkt. Wir (Giertz, Hahn u. Rummel) beobachteten jedoch an Katzen in Chloralosenarkose eine antagonistische Wirkung von Pendiomid auf Coramin, die allerdings vom Dosenverhältnis beider Stoffe zueinander abhing und durch höhere Dosen Coramin durchbrochen werden konnte. Im folgenden sollen diese Untersuchungen durch Heranziehung eines weiteren Analepticums (Cardiazol = Pentamethylentetrazol) und unter Berücksichtigung des Einflusses der Narkose (Urethan, Chloralose) und der Tierart (Kaninchen, Katze) auf eine breitere Basis gestellt werden.

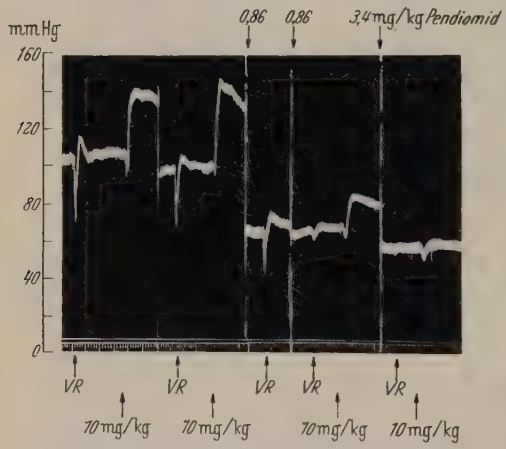



Abb. 1. Katze 2,9 kg ♂ · 100 mg/kg Chloralose. Entzügelt. Künstliche Atmung. Zeit 10 sec. VR: Reizung des rechten peripheren Vagusstumpfes.

## Versuche an Katzen in Chloralosenarkose.

Versuche an 26 Katzen, von denen 21 durch Vagotomie und Carotisabklemmung zur besseren Darstellung der pressorischen Cardiazolwirkung entzügelt waren. Narkose mit 100 mg/kg Chloralose intravenös.

Aus Abb. 1[1] geht hervor, daß Pendiomid in einer Dosierung, die gerade die Wirkung einer elektrischen Reizung des peripheren Vagusstumpfes[2] auf den Blutdruck aufhebt, den Effekt einer gut wirksamen Cardiazoldosis (10 mg/kg) abschwächt. Zur Auslöschung der Cardiazolwirkung ist aber eine höhere Dosis nötig (insgesamt 3,5 mg/kg). Aber diese Hemmung ist nicht absolut. Wie Abb. 2 zeigt, läßt sich selbst gegen höhere Pendiomiddosen (z. B. 20 mg/kg) mit entsprechend erhöhten Cardiazoldosen (z. B. 100 mg/kg) eine Blutdrucksteigerung erzielen. Aber auch diese wird durch eine noch höhere Pendiomiddosis (50 mg/kg) wieder aufgehoben. Etwa ab 50 mg/kg zeigt Cardiazol bei vollständiger Blockierung seiner blutdrucksteigernden Wirkung die auch in Abb. 2 sichtbare depressorische Wirkung.

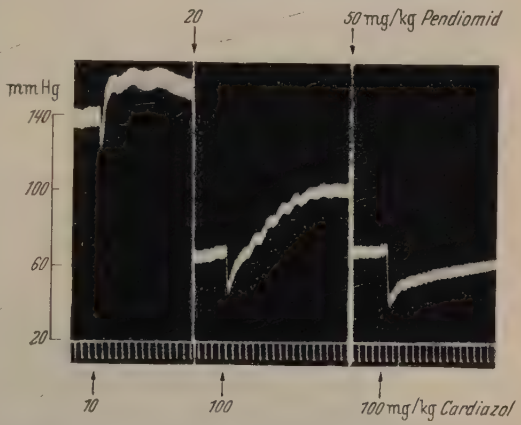



Abb. 2. Katze 2,3 kg ♀ · 100 mg/kg Chloralose. Entzügelt. Künstliche Atmung. Zeit: 30 sec.

In Tab. 1 sind die blockierbaren und nichtblockierbaren Cardiazoldosen für eine Reihe verschiedener Pendiomiddosen wiedergegeben. Es

Tabelle 1. *Katzen in Chloralosenarkose. Darstellung der Wirkungsbeziehungen zwischen Pendiomid und Cardiazol.*

| Pendiomid (mg/kg) | Cardiazoldosen (mg/kg)[3] | |
|---|---|---|
| | mit aufgehobener Wirkung | mit reduzierter Wirkung |
| 1,7 | | 7—10 |
| 2,5 | 5—7 | 8—14 |
| 3,5—4 | 7—9 | 8 |
| 5 —7,5 | | 10—30 |
| 10 | 10 | 20—30 |
| 20 | 20 | 50—100 |
| 50 —100 | 50—100 | 200 |
| 200 | | 200 |

[1] Alle Injektionen der Analeptika und des Pendiomid erfolgten intravenös.

[2] Die Reizung erfolgte mit einem Reizgerät: 5 sec lang; 10 Hz; 1 msec; 20 mA.

[3] Um bei den hohen Dosen von Cardiazol, die wir in 25—50%igen Lösungen gaben, osmotische Effekte auszuschließen, wurden Kontrollen mit hochprozentigen NaCl- und Zuckerinjektionen durchgeführt.

geht hieraus hervor, daß die Dosiswirkungsbeziehungen zwischen Cardiazol und Pendiomid in befriedigender Weise einem reziproken Antagonismus entsprechen. Mit hohen Cardiazoldosen läßt sich oft eine dauerhafte Deblockierung erzielen.

Bei den hohen Cardiazoldosen ab 50 mg/kg wurden zur Vermeidung von Krämpfen 1—3 mg/kg d-Tubocurarin gegeben. In Kontrollversuchen ergab sich auch für d-Tubocurarin eine abschwächende Wirkung auf Cardiazol, die bei den Versuchsergebnissen mitberücksichtigt werden muß.

### Versuche an Katzen in Urethannarkose.

In der Urethannarkose (1,75—2,0 g/kg subcutan) hat auch Coramin meist eine gut ausgeprägte blutdrucksteigernde Wirkung (Giertz, Hahn u. Rummel), weshalb wir im folgenden die Wirkung von Pendiomid auf beide Analeptika meist gleich-

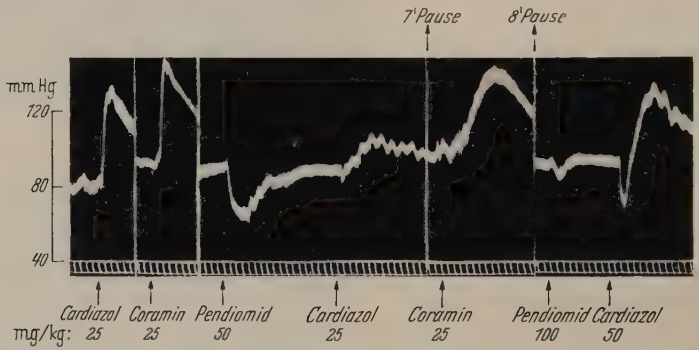



Abb. 3. Katze 3,9 kg ♀. 1,75 g/kg Urethan. Künstliche Atmung. Zeit 30 sec.

zeitig prüfen konnten. Eigentümlich für diese Narkose ist ferner, daß zur Blutdrucksteigerung höhere Dosen der Analeptika als bei Chloralose erforderlich sind (vgl. die Tabelle in der Arbeit von Giertz, Hahn u. Rummel). Der analeptische Blutdruckeffekt aber wird durch Pendiomid weniger gehemmt als in Chloralosenarkose.

Im Gegensatz zu den in Tab. 1 dargestellten Befunden zeigt Abb. 3, daß die Wirkung von 25 mg/kg Cardiazol auch durch 50 mg/kg Pendiomid nur abgeschwächt, aber nicht aufgehoben wird und daß selbst nach Zufuhr von weiteren 100 mg/kg Pendiomid eine Verdoppelung der Cardiazoldosis genügt, um den ursprünglichen Effekt wieder auftreten zu lassen. Eine blutdrucksenkende Komponente der Cardiazolwirkung macht sich auch hier bei der höheren Dosierung bemerkbar. Beim Coramin zeigt sich die abschwächende Wirkung des Pendiomids in diesem Versuch sogar nur in einer geringeren Steilheit des Blutdruckanstieges.

In Abb. 3 fällt noch auf, daß die durch Pendiomid ausgelöste Blutdrucksenkung spontan rasch wieder zurückgeht. Die gleiche Beobachtung machten wir auch in anderen Urethanversuchen. Dabei konnten wir auch feststellen, daß nach der spontanen Rückkehr des Blutdruckes zum Ausgangsniveau neuerliche Pendiomidgaben

den Blutdruck nicht mehr senkten. Es handelt sich hier also nicht um ein Nachlassen der Pendiomidwirkung, sondern um eine ihrem Wesen nach unbekannte Umstellung des Kreislaufs (Adrenalinausschüttung?).

Versuche an 10 entzügelten und 5 nicht entzügelten Katzen ergaben, daß mit Pendiomiddosen von 50—200 mg/kg (evtl. wiederholt) gegenüber 12,5—200 mg/kg Cardiazol und 50—100 mg/kg Coramin stets eine Reduktion der Blutdruckwirkung, aber nur teilweise eine Auslöschung zu erzielen war, ohne daß eine klare Dosiswirkungsbeziehung wie in der Chloralosenarkose zum Vorschein kam. Das Coramin war etwas weniger hemmbar als Cardiazol.

In den Urethanversuchen wurde wegen der besseren krampfhemmenden Eigenschaften des Urethan nur manchmal Curare gegeben.

### Versuche an Kaninchen in Chloralosenarkose.

Versuche an 14 Kaninchen (7 entzügelt). Narkose mit 125 mg/kg Chloralose intravenös. Gut wirksame Dosen der Analeptica vor Pendiomidzufuhr waren gewöhnlich 10—12,5 mg/kg Cardiazol und 20—25 mg/kg Coramin.

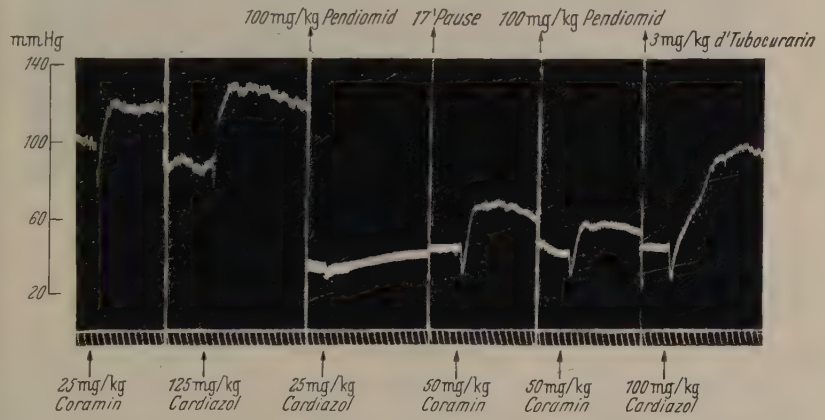



Abb. 4. Kaninchen 2,7 kg ♂ · 1,25 mg/gk Chloralose. Entzügelt. Künstliche Atmung. Zeit: 30 sec.

Die blutdrucksteigernde Wirkung dieser Dosen ließ sich schon durch 5—10 mg/kg Pendiomid abschwächen und durch 50—100 mg/kg Pendiomid aufheben. Beim Coramin kann, wie Abb. 4 zeigt, schon eine Verdoppelung der Ausgangsdosis (in anderen Versuchen erst das 4fache) genügen, um die Pendiomid-Wirkung wieder zu durchbrechen. Um die Cardiazolwirkung wieder zu erlangen, war immer eine größere Dosissteigerung nötig, z. B. auf das 8fache der Ausgangsdosis in Abb. 4. Die Wirkung der höheren Cardiazoldosen (50—100 mg/kg) und Coramindosen (50—100 mg/kg) blieb auch gegenüber wiederholten Gaben von 100 mg/kg Pendiomid resistent.

Auch in diesen Versuchen wurde von 100 mg/kg Cardiazol und Coramin aufwärts d-Tubocurarin (3 mg/kg) verabreicht.

### Versuche an Kaninchen in Urethannarkose.

Versuche an 19 Kaninchen (11 entzügelt). 1,75—2 g/kg Urethan subcutan.

Die blutdrucksteigernde Wirkung von 20—40 mg/kg Cardiazol und 50—75 mg/kg Coramin wurde schon durch 5—25 mg/kg Pendiomid abgeschwächt. Aber das Ausmaß dieses Effektes ließ sich durch Erhöhung der Pendiomiddosen auf 50—100 mg/kg nur noch wenig verstärken. Eine vollständige Blockierung kam in der Regel nicht zustande. Auch durch Wiederholung der Pendiomidgaben oder durch Erhöhung auf 200 mg/kg als Einzeldosis ließ sich nicht mehr erreichen. Sehr schön

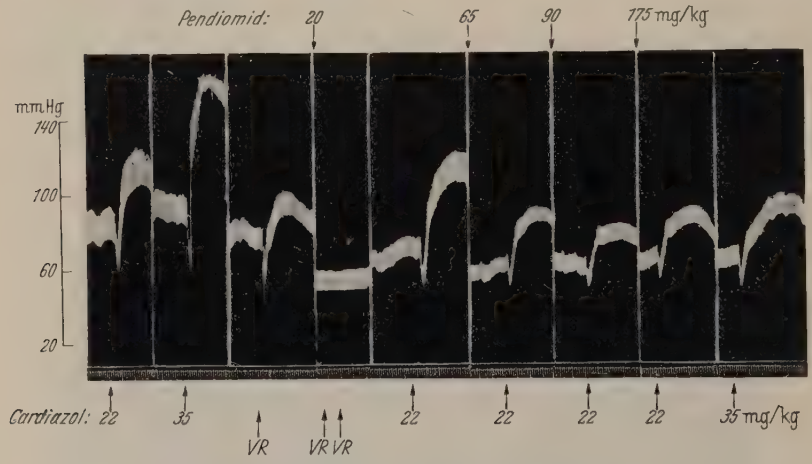



Abb. 5. Kaninchen 2,3 kg · 1,75 g/kg Urethan. Entzügelt. Künstliche Atmung. Zeit: 10 sec. VR: Reizung des rechten peripheren Vagusstumpfes.

zeigt sich in Abb. 5 diese durch Steigerung der Pendiomiddosen nicht überschreitbare Grenze der Pendiomidwirkung gegenüber Cardiazol. Cardiazol und Coramin verhielten sich in diesen Versuchen ziemlich gleich.

### Besprechung der Ergebnisse.

Der von uns festgestellte hemmende Einfluß der Ganglienblockade auf die blutdrucksteigernde Wirkung von Cardiazol und Coramin ist früheren Untersuchern vielleicht deshalb entgangen, weil die optimalen Versuchsbedingungen nicht vorlagen. Der reziproke Charakter des zwischen Analeptika und Ganglienblockade bestehenden Antagonismus hat zur Folge, daß bei zu schwacher Dosierung des Ganglienblockers bzw. relativ zu hoher Dosierung des Analeptikums die Blockade unsichtbar bleiben kann. Pendiomiddosen, die zur Aufhebung der Wirkung einer elektrischen Vagusreizung auf den Blutdruck ausreichen, genügen nicht einmal, um die Wirkung niedriger, das heißt schwellennaher Analeptikumdosen vollständig zu unterdrücken. An Hand des Vagustestes aber hat

Serin seine Ganglienblockade eingestellt. Zudem wird mit steigender Dosierung des Analeptikums die Wirkung auch höherer Pendiomidgaben je nach Tierart und Narkose immer unsicherer. Nur bei Katzen in Chloralosenarkose war bis in den Bereich sehr hoher Cardiazoldosen hinein eine blockierende Pendiomidwirkung mit entsprechenden Dosen zu erreichen. Der Übergang von der Chloralosenarkose zur Urethannarkose sowie von der Katze zum Kaninchen verschlechtert grundsätzlich die Hemmungswirkung des Pendiomid auf höhere Dosen der Analeptika. Es zeichnen sich hier absolute Grenzen der Pendiomidwirkung ab, die auf die Existenz nichtblockierbarer Nervenbahnen hinweisen.

Andererseits deutet der besonders bei Katzen in Chloralosenarkose ausgeprägte reziproke Antagonismus auf eine deblockierende Wirkung der Analeptika hin. Auch Serin hat zur Erklärung der von ihm beobachteten Wirkungslosigkeit der Ganglienblockade auf die Blutdruckwirkung von Coramin sowohl eine stimulierende Wirkung des Coramin auf die Ganglien als auch die Existenz nichtblockierbarer Bahnen diskutiert. Nur sind wir der Auffassung, daß eine direkte Wirkung der Analeptika auf die Ganglien vielleicht weniger in Frage kommt als eine indirekte, von den Zentren ausgehende, zumal Bein u. Meier für das Coramin eine Ganglienwirkung nicht nachweisen konnten. Nichtblockierbare Bahnen werden auch von Moe u. Freyburger sowie von Heim u. Wagner angenommen, da sie die anoxämische Blutdrucksteigerung mit Ganglienblockern nicht aufheben konnten.

Die Abhängigkeit der Pendiomidwirkung von Tierart und Narkose weist auf die Bedeutung der strukturellen Organisation des komplexen Blutdruckregulationssystems hin, dessen Areale nicht nur in der Medulla oblongata, sondern ebenso in höheren wie in niedrigeren Abschnitten des ZNS einschließlich Rückenmark zu suchen sind. Die Chloralose fördert, namentlich bei Katzen, die Empfindlichkeit der höheren Zentren gegenüber Analeptika, was sich in einer Steigerung der pressorischen Cardiazolwirkung und der depressorischen Coraminwirkung äußert (Giertz, Hahn u. Rummel). Wir vermuten, daß die von höheren Zentren ausgehenden Erregungen leichter zu blockieren sind als die von niedrigeren Zentren ausgehenden, vielleicht infolge eines multisynaptischen Baues ihrer Nervenbahnen. Dies macht allerdings die Annahme erforderlich, daß die Ganglienblocker auch auf intrazentrale Synapsen wirken. Doch kann sich diese Annahme auf neuere Befunde von Dontas u. Nickerson stützen.

In Urethannarkose hingegen scheinen vornehmlich niedrigere Zentren mit vermutungsweise schlechter blockierbaren Bahnen auf die Analeptika anzusprechen. Wir finden hier eine geringere Wirksamkeit des Cardiazol und ein stärkeres Hervortreten der pressorischen Coraminwirkung (Giertz, Hahn u. Rummel), was der in früheren Untersuchungen (Hahn) an der Spinalkatze festgestellten stärkeren Affinität des

Coramin zu niederen pressorischen Zentren entsprechen würde. Auch daß bei Katzen in Urethannarkose die Coraminwirkung schlechter blokkierbar ist als die Cardiazolwirkung, fügt sich dieser Betrachtungsweise.

Die geringere Blockierbarkeit der Cardiazol- und Coraminwirkung bei Kaninchen entspricht vielleicht einer einfacheren Struktur des Blutdruckregulationssystems bei dieser Tierart. Schon aus unseren früheren Untersuchungen (Hahn u. Simon; Giertz, Hahn u. Rummel) geht hervor, daß hier die Wirkung der Narkotica weniger differenziert ist und die Unterschiede zwischen Cardiazol und Coramin kleiner sind. Die Befunde weisen auf eine geringere Entwicklung übergeordneter dualistischer Zentren, wie wir sie bei Katzen mit der intravertebralen Injektion nachweisen konnten (Hahn u. Rummel).

Erwähnenswert sind noch die blutdrucksenkenden Cardiazolwirkungen bei Katzen, welche nach vollständiger Blockade der pressorischen Wirkung sichtbar wurden. Es handelt sich hier wohl um zentral bedingte depressorische Effekte, von denen wir durch vorausgehende Versuche mit Coramin wissen, daß sie gegen Ganglienblockade resistenter sind als die pressorischen. Für periphere depressorische Cardiazolwirkungen gibt es keine Hinweise (vgl. z. B. Zinnitz u. v. Bergmann). Dagegen ließen sich zentral bedingte Blutdrucksenkungen durch intravertebrale Injektion von Cardiazol nachweisen (Hahn u. Rummel).

## Zusammenfassung.

1. Pendiomid vermag die blutdrucksteigernde Wirkung von Cardiazol und Coramin mehr oder weniger zu hemmen.

2. Die Hemmungswirkung ist stärker bei Katzen als bei Kaninchen und stärker in Chloralosenarkose als in Urethannarkose.

3. Bei Katzen in Chloralosenarkose konnte zwischen Cardiazol und Pendiomid ein weitgehender reziproker Antagonismus nachgewiesen werden.

4. Die Coraminwirkung ist bei Katzen in Urethannarkose etwas weniger leicht blockierbar als die Cardiazolwirkung.

## Literatur.

Bein, H. J., u. R. Meier: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 273 (1953). — Dontas, A. S., u. M. Nickerson: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 16 (1955). — Giertz, H., F. Hahn u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 120 (1955). — Hahn, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 509 (1941). — Hahn, F., u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 325 (1950). — Hahn, F., u. K. Simon: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 563 (1947). — Heim, F., u. H. Wagner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 343 (1953). — Moe, G. K., u. W. A. Freyburger: Pharmacologic. Rev. **2**, 61 (1950). — Serin, F.: Acta pharmacol. (Kopenh.) **9**, 59 (1953). — Zinnitz, F., u. F. v. Bergmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 335 (1936).

Prof. Dr. F. Hahn, Düsseldorf, Pharmakol. Inst. d. Med. Akademie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 467—472 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Graz (Vorstand: Prof. Dr. K. Gotsch).

# Einfluß von Lanthanchlorid auf Erythrocyten und Blutgerinnung.

Von

K. Wagner, S. Sailer und H. Neun.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 15. Juni 1955.)*

Der Umstand, daß Vertreter der seltenen Erdelemente als Antikoagulantien in letzter Zeit Eingang in die Therapie gefunden haben, veranlaßte uns, mit $LaCl_3$ in vitro Untersuchungen über den Einfluß auf die Erythrocyten und die Blutgerinnung anzustellen. Unser Interesse galt hierbei den Besonderheiten der Erythrocyten-Agglutination und den Ursachen der Blutgerinnungsverzögerung.

## 1. Einfluß von $LaCl_3$ in vitro auf Erythrocyten.

Ausgehend von einer 1%igen Lösung von $LaCl_3$ in physiologischer Kochsalzlösung stellten wir uns durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung eine Konzentrationsreihe bis 0,0001% her und versetzten je einen Tropfen dieser $LaCl_3$-Verdünnungen mit je einem Tropfen einer 2%igen Suspension 3mal gewaschener Erythrocyten des Menschen. Bei Zusatz von 1%igem $LaCl_3$ erfolgte innerhalb kürzester Zeit eine grobe, nicht mehr aufschüttelbare Agglutination der Erythrocyten. Mit fallender $LaCl_3$-Konzentration fiel die Agglutination feiner aus und trat später in Erscheinung, um schließlich bei einer Grenzkonzentration von 0,02% $LaCl_3$ eben noch nachweisbar zu sein. Die Beurteilung des Vorhandenseins und Ausmaßes einer Agglutination erfolgte makroskopisch und mikroskopisch im Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskop. In den stärkeren $LaCl_3$-Konzentrationen zeigten die Erythrocyten Stechapfelformen. Eine Hämolyse wurde mit den von uns verwendeten $LaCl_3$-Konzentrationen auch nicht beim Zusammenfügen in Agglutinationsröhrchen beobachtet. Erythrocyten von Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen zeigten gleiches Verhalten. Die Agglutination ist daher als unspezifisch zu bezeichnen.

Ausgehend von den Überlegungen Hirschfelds, daß der Wirkungsmechanismus verschiedener konglutinierender Substanzen in einer Annäherung der Erythrocyten gesucht werden könne, haben wir den Hämatokritwert einer Erythrocytensuspension mit gleichen Zusätzen

verschiedener $LaCl_3$-Konzentrationen und physiologischer Kochsalzlösung verglichen. Hierbei zeigte sich nur in den zur Agglutination führenden $LaCl_3$-Konzentrationen eine Abnahme des Hämatokritwertes gegenüber dem Kontrollwert mit physiologischer Kochsalzlösung.

Es war naheliegend, zu untersuchen, ob durch Zusatz kleiner Mengen selbst nicht zur Agglutination führender $LaCl_3$-Konzentrationen bei Anwesenheit inkompletter Erythrocytenantikörper eine Agglutination zustande kommt. Untersuchungen in dieser Richtung haben ein negatives Resultat ergeben. Auch konnte ein bekannter Titer von kompletten Hämagglutininen durch Zusatz von selbst nicht zur Agglutination führenden $LaCl_3$-Konzentrationen nicht erhöht werden.

Um Aufschluß über die Bindungsfestigkeit des $LaCl_3$ an die Erythrocyten zu erhalten, wurden die agglutinierten Erythrocyten in einem Überschuß an physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gewaschen. Dabei zeigte sich, daß die Agglutination durch wiederholtes Waschen zum Teil rückgängig gemacht werden kann.

Unsere weiteren Untersuchungen galten der Fragestellung, ob durch entsprechende Behandlung gewaschener Erythrocyten mit Formalin, also durch gewisse strukturelle Veränderungen der Erythrocyten, der Ausfall der Agglutination durch $LaCl_3$ beeinflußt werden könne.

Formaldehyd führt nach Jung u. Onen bereits in geringen Mengen zu einer Verfestigung bestimmter Strukturelemente der roten Blutkörperchen, ohne daß sich dabei wesentliche Schädigungen des Zellstoffwechsels nachweisen ließen. Auch bei Anwendung höherer Formaldehydkonzentrationen könne es sich um keine eigentliche Fixation der Zellen handeln, da die Auswaschbarkeit des Hämoglobins unbeeinflußt bleibe. Es würden lediglich durch Formaldehyd innerhalb der Zellen einige Strukturen beispielsweise gegenüber Hypotonie stabilisiert. Bei einer geringen Formaldehydkonzentration binde sich der Aldehyd zu einem erheblichen Anteil spezifisch und reversibel an das Hämoglobin. Diese Bindung ist bei Konzentrationen von über $10^{-13}$ g/ml weitgehend abgesättigt. Es tritt nun Bindung an andere Gruppen auf, die insbesondere an den Strukturproteinen der Zellen lokalisiert sein dürften. Diese Bindungen sind zu einem erheblichen Anteil irreversibel. Wichtig erscheint aber, daß bestimmte Strukturelemente in der Zelle fixiert werden, noch bevor erhebliche Störungen des Zellstoffwechsels nachweisbar sind. Es sei also durchaus mit der Möglichkeit eines aktiven Ionentransportes durch die „adstringierte" Zelle zu rechnen.

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir eine etwa 50%ige Suspension dreimal gewaschener Erythrocyten und versetzten 9 Teile dieser mit einem Teil 40%igen Formalins. Diese Mischung verblieb für 24 Std bei einer Temperatur von $+4°$ C. Anschließend wurden die Erythrocyten durch neuerliches mehrmaliges Waschen von noch freiem Aldehyd befreit und für weitere Agglutinationsversuche in eine 2%ige Suspension gebracht. Im Gegensatz zu unbehandelten Erythrocyten erfolgte selbst bei Zusatz von 1%iger $LaCl_3$-Lösung nur sehr spät eine makroskopisch erkennbare feine Agglutination und blieb diese

makroskopisch bei Zusatz von 0,1%iger $LaCl_3$-Lösung überhaupt aus. Mikroskopisch zeigte sich bis zu einer Grenzkonzentration von 0,05% $LaCl_3$ eine feine Agglutination. Morphologisch fiel auf, daß die Erythrocyten unter dem Einfluß stärkerer $LaCl_3$-Konzentrationen keine Stechapfelformen annahmen. Sie behielten auch im Agglutinat die bikonkave Scheibenform bei und blieben voneinander deutlich abgrenzbar. In weiteren Versuchen zeigte sich, daß mit der zeitlichen Dauer der Formalineinwirkung die Stärke der Agglutination bei gleichbleibender $LaCl_3$-Konzentration abnahm. Dieser Umstand, wie die Tatsache, daß die Erythrocyten nach der Vorbehandlung mit Formalin mehrmals gewaschen wurden, sprachen dafür, daß die Verminderung der Agglutination auf die durch Formalin bewirkten strukturellen Veränderungen der Erythrocyten zurückzuführen ist. Diese Agglutinationshemmung mit Formalin vorbehandelter Erythrocyten zeigte sich besonders deutlich auch bei Zusatz von agglutinierenden Blutgruppen-Testseren.

### 2. Einfluß von $LaCl_3$ auf die Blutgerinnung in vitro.

Wird Blut mit geringen Mengen einer $LaCl_3$-Lösung zusammengebracht, so erhöht sich die Blutgerinnungszeit um ein Vielfaches. Eine Prüfung der Gerinnungszeit nach Lee-White ergab:

| | 1. Röhrchen Normalblut | 2. Röhrchen Normalblut + 0,05 $LaCl_3$ * | 3. Röhrchen Normalblut + 0,10 $LaCl_3$ | 4. Röhrchen Normalblut + 0,15 $LaCl_3$ |
|---|---|---|---|---|
| Ger. Zeit: | 4 min 25 sec | 5 min 10 sec | 7 min 55 sec | 15 min 30 sec |

* $LaCl_3$ in ml einer 1,1%igen Lösung angegeben.

In weiteren Untersuchungen wurden sämtliche Gerinnungsfaktoren von normalem Citratblut, als auch von Citratblut mit Zusätzen steigender Mengen von $LaCl_3$ bestimmt. Wir prüften dabei:

Bestimmung der Prothrombinzeit nach der Methode von Marbet-Wintersteín.

Bestimmung des Prothrombins im modifizierten Einphasenverfahren nach Schultze u. Schwick (Normalwert 26—32 sec).

Bestimmung des Faktors VII im modifizierten Einphasenverfahren nach Schultze u. Schwick (Normalwert 35—40 sec).

Bestimmung des Faktors V im modifizierten Einphasenverfahren nach Schultze u. Schwick (Normalwert 35—38 sec).

Bestimmung der Recalcifikationszeit nach der von Schultze u. Schwick angegebenen Modifikation (Normalwert 80—130 sec).

Heparin-Toleranztest nach der Vollblutmethode von Marbet-Winterstein (Normalwert 2 min 15 sec).

Bestimmung des Thrombininhibitors und des Progressiv-Antithrombins nach der von Schultze u. Schwick angegebenen Methode.

Bei der Prüfung des Thrombininhibitors und des Progressiv-Antithrombins zeigten sich bei Einhaltung obiger Versuchsbedingungen unter Zusätzen von $LaCl_3$ keine signifikanten Änderungen gegenüber den Ausgangswerten. Auch die Calciumwerte erfuhren keine Änderung.

Für die Bestimmung des Fibrinogens bedienten wir uns des üblichen Verfahrens einer Fällung mit Calciumchlorid aus Citratplasma. Dabei zeigte sich, daß der Fibrinogengehalt in dem Maße abnahm, wie sich die Gerinnungszeit des Citratplasmas verlängerte. Man hätte daher zunächst annehmen können, daß die durch $LaCl_3$ verursachte Verlängerung der Blutgerinnungszeit auf eine Verminderung des Fibrinogens zurückgeführt werden könnte. Als sich aber durch Hinzufügen von Thrombin

**Ergebnisse.**

| | Prothrombinzeit | Prothrombin sec | Faktor VII sec | Faktor V sec | Recalc. Zeit sec | HTT sec |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Norm. Citr. Blut (0,5 cm³ Na Citr. + 4,5 Blut) | 100% | 29 | 31 | 25 | 92 | 120 |
| Norm. Citr. Blut + 0,05 (0,00055) $LaCl_3$ | 85% | 44 | 39 | 34 | 143 | 160 |
| Norm. Citr. Blut + 0,10 (0,0011) $LaCl_3$ | 30% | 245 | 120 | 38 | 312 | 285 |
| Norm. Citr. Blut + 0,15 (0,0017) $LaCl_3$ | 0 | 1125 | 550 | 52 | 842 | 705 |

zu Citratplasma, dessen Gerinnungszeit durch $LaCl_3$ stark verlängert war, wieder normale Fibrinogenwerte zeigten, war erwiesen, daß die Gerinnungsverzögerung nicht durch eine Verminderung des Fibrinogens, sondern wahrscheinlich durch eine Ausfällung des Prothrombins verursacht war.

Auf die Fibrinolyse hatte $LaCl_3$ keinen nennenswerten Einfluß, wie sich aus den Fibrinogenwerten nach 24 Std zeigte.

**Tauschversuch.**

| | |
|---|---|
| Recalcifizierungszeit von Normalplasma | 81 sec |
| Recalcifizierungszeit von Normalplasma mit 0,075 ml $LaCl_3$ | 215 sec |
| Recalcifizierungszeit von Marcoumarplasma (bei Prothrombinzeit von 20%) | 279 sec |
| Recalcifizierungszeit von Haemophilie A Plasma | 465 sec |
| 0,05 ml $LaCl_3$ Pl. + 0,05 ml Norm. Plasma | 114 sec |
| 0,05 ml $LaCl_3$ Pl. + 0,05 ml Norm. Serum | 90 sec |
| 0,05 ml $LaCl_3$ Pl. + 0,05 ml Marcoumar Plasma | 214 sec |
| 0,05 ml $LaCl_3$ Pl. + 0,05 ml Haemophilie A Plasma | 134 sec |

Auf Grund der Tatsache, daß sich die durch Zusatz von $LaCl_3$ stark verlängerte Recalcifizierungszeit eines Normalplasmas auf Zusatz von Marcoumar-Plasma nicht verkürzen ließ, während auf Zusatz von

Normalplasma, Normalserum und Hämophilie-A-Plasma eine annähernde Normalisierung der Recalcifizierungszeit erfolgte, muß ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wie bei den Cumarinen angenommen werden.

## Thrombelastographie.

Wir führten Parallelbestimmungen von Citratplasma ohne und mit Zusätzen steigender Mengen von $LaCl_3$ durch.

Abb. 1 zeigt die Kurve eines recalcifizierten Normalcitratplasmas (I) und daneben in Parallelschreibung die Kurve des gleichen recalcifizierten Normalcitratplasmas nach Zusatz von 0,0072 ml $LaCl_3$ (II). Es findet sich als Ausdruck der herabgesetzten Gerinnungsbereitschaft eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeit ($r$) und auch der Gerinnungsbildungszeit ($k$), während die Gerinnselfestigkeit im Gegensatz zur Heparinkurve nur gering oder überhaupt nicht beeinflußt wird. Die ersichtliche $LaCl_3$-Kurve läßt eine gewisse Ähnlichkeit mit einer Dicumarolkurve erkennen.

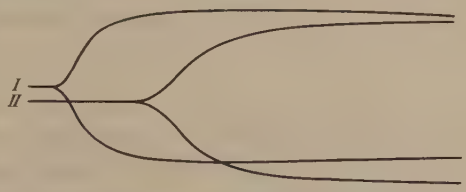


Abb. 1. Thrombelastogramm ohne (I) und mit $LaCl_3$ (II).

## Zusammenfassung.

In vitro konnte mit $LaCl_3$ bis zu einer Grenzkonzentration von 0,02% eine mit steigender Konzentration zunehmende unspezifische Agglutination der Erythrocyten festgestellt werden. Das Ausmaß der Agglutination nahm bei nachfolgender Waschung der Agglutinate ab. Eine nicht mehr zur Agglutination führende 0,01%ige $LaCl_3$-Lösung war nicht imstande, den Agglutinationstiter eines Hämagglutinins zu erhöhen. Nach Vorbehandlung der Erythrocyten über eine gewisse Zeit mit Formalin zeigte sich selbst bei höheren $LaCl_3$-Konzentrationen nur eine feine und später in Erscheinung tretende Agglutination. Die Erythrocyten erwiesen sich mikroskopisch als bikonkav formbeständig. In derselben Weise fand sich eine Agglutinationshemmung Formalinvorbehandelter Erythrocyten auf Zusatz von agglutinierenden Testseren.

Die mit Zusätzen steigender Mengen von $LaCl_3$ zunehmende Blutgerinnungsverzögerung ist vorwiegend eine Antiprothrombinwirkung, wenn auch in geringerem Maße Faktor VII herabgesetzt wird. Eine Fibrinogenverminderung und ein Einfluß auf die Fibrinolyse und das Calcium konnte mit den von uns verwendeten $LaCl_3$-Konzentrationen nicht beobachtet werden. Thrombelastographisch zeigte sich unter der

Einwirkung von $LaCl_3$ eine gewisse Ähnlichkeit mit einer Dicumarol-Kurve. Die Gerinnungsverzögerung dürfte wahrscheinlich durch eine Ausfällung bzw. Inaktivierung durch Komplexbildung des im Plasma zirkulierenden Prothrombins und des Faktors VII verursacht sein.

## Literatur.

Hirschfeld, L., u. St. Dubiski: Schweiz. Z. allg. Path. **1**, 86 (1954). — Jung, F., u. K. Onen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 179 (1955). — Marbet, R., u. A. Winterstein: Die Medizinische **25**, 877 (1954). — Schultze, H., u. G. Schwick: Behring Laboratoriumsblätter, Heft 2, Okt. 1953.

Dr. K. Wagner, Med. Univ. Klinik, Graz/Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 473—485 (1955).

Aus dem Gewerbehygienisch-Pharmakologischen Institut der Badischen Anilin- und Sodafabrik AG. Ludwigshafen/Rhein (Leiter: Prof. Dr. med. H. Oettel).

# Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen.

I. Mitteilung*.

Von

H. Oettel und G. Wilhelm-Kollmannsperger.

Mit 4 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 9. Juli 1955.)*

Seit den Untersuchungen von Heubner u. Mitarb. (1933—39) gilt das Chamazulen als der entzündungshemmende Bestandteil der Kamille. Als Testobjekt verwendete Heubner die Senfölchemosis an Kaninchen und Katze und die Ultraviolettentzündung an der Ratte, am Schwein und am Menschen.

Zahlreiche Untersucher haben seither die antiphlogistische Wirkung des Chamazulens im Tierversuch und am Menschen bestätigt (Albath, Jaretzky u. Neuwald, Neuwald, Pommer, Kagelmacher, Janistyn, Herz, Bosch, Krüger-Nilsen, Jung u. Mitarb.). Kohlstaedt, Staab u. Kesper bezeichnen auf Grund dieser Befunde Kamillenzubereitungen, die kein Azulen enthalten, vom pharmakologischen und medizinischen Standpunkt aus als minderwertig. Sie schlagen ebenso wie Kaiser u. Frey eine Wertbestimmung und Standartisierung von Kamillenzubereitungen auf Grund ihres Gehaltes an Chamazulen vor.

Auch für das natürlich vorkommende Guajazulen sowie für mehrere synthetische Azulene (1-Isopropyl-5-methylazulen, 1-Isopropyl-5,6-dimethylazulen, 6-Isopropyl-1,4-dimethylazulen, 1,4-Dimethyl-7-isopropylazulen, Azulencarbinol, 1-Isopropyl-5-methylazulen-6-Karbonsäure) wurde im Tierversuch und am Menschen eine entzündungshemmende Wirkung festgestellt (Jung u. Mitarb., Mahler, Herz, Roeckerath, Hellriegel u. Keudel, Janistyn).

Lediglich eine Arbeitsgruppe (Hesse, Altner u. Zeppmeisel) berichtete vor unserer eigenen Mitteilung*, daß sie bisher mit keiner tierexperimentellen Methode für Kamillenzubereitungen bzw. Azulene eine entzündungshemmende Wirkung habe feststellen können. Leider geben Hesse, Altner u. Zeppmeisel, die insgesamt 6 verschiedene Kamillenextrakte und 2 Azulenpräparate an der Senfölchemosis des Kaninchens, der Kupfersulfatpleuritis nach Gold, der Hefepleuritis nach Pohl und an Lichterythemen von Ratte und Kaninchen untersuchten, keinerlei Einzelheiten über die Zusammensetzung der untersuchten Produkte, über Methodik und Ergebnisse sowie über die verwendeten Tierzahlen an. Die Autoren stellen lediglich fest, daß die Kamille viel zu schwach antiphlogistisch wirke, als daß diese Wirkung mit den uns zur Verfügung stehenden, „immerhin recht groben Methoden" einwandfrei erfaßbar wäre.

* Über die Ergebnisse der Versuche wurde bereits auf dem Pharmakologenkongreß in Bonn 1953 kurz berichtet (Kollmannsperger u. Oettel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 228 (1954).

Neuerdings berichteten auch Brock u. Mitarb. über durchweg negative Ergebnisse bei der Untersuchung von Azulenen im Tierexperiment. Diese Autoren bestätigen also unsere bereits vorher kurz mitgeteilten und im folgenden näher aufgeführten Beobachtungen.

Die beim Tier bisher am häufigsten zur Testung der entzündungshemmenden Wirkung von Azulenen angewandten *Methoden* sind die Senfölchemosis am Kaninchen (Heubner u. Grabe, Heubner u. Albath, Jaretzky u. Neuwald, Neuwald, Hesse, Altner u. Zeppmeisel, Herz) und am Meerschweinchen (Jaretzky u. Neuwald, Pommer, Mahler, Jung u. Mitarb.).

Im Zusammenhang mit der Prüfung entzündungserregender und entzündungshemmender Stoffe im Tierversuch haben auch wir diese beiden Testverfahren auf ihre Eignung zum Nachweis antiphlogistischer Wirkungen geprüft.

## I. Senfölchemosis am Meerschweinchen.

(Orientierende Vorversuche.)

In orientierenden Vorversuchen wurde bei 25 Meerschweinchen nach der Technik von Jung, Schoetensack u. Bruno durch Instillation von 30- bzw. 50%igem Senföl (4 Tropfen innerhalb von 2 Tagen) eine Chemosis beider Augen erzeugt. Es ergaben sich sehr große Unterschiede in der Reaktion verschiedener Tiere, bei einigen nur kurzdauernde, leichte Bindehautrötung, bei anderen sehr starke, wochenlang anhaltende Hornhauttrübung und Eitersekretion, überdies aber auch erhebliche Unterschiede zwischen beiden Augen derselben Tiere. Diese außerordentlich großen Schwankungen der Ergebnisse dürften in erster Linie durch die Schwierigkeit einer genauen Dosierung des Senföls bedingt sein: kleiner, sehr enger Bindehautsack, dadurch oft sofortiges Abfließen des eingeträufelten Produktes; sie machen die Methode nach unseren Erfahrungen zur Testung entzündungshemmender Produkte ungeeignet.

## II. Senfölchemosis am Kaninchen.

In einigen weiteren *Vorversuchen* erwiesen sich die Schwankungen der Ergebnisse bei der Senfölchemosis des Kaninchens geringer als beim Meerschweinchen: weiterer Bindehautsack, daher bessere Möglichkeit einer exakten Dosierung des Senföls sowie des zu untersuchenden Produktes. Außerdem ist infolge der größeren anatomischen Verhältnisse beim Kaninchen die Beurteilung der Entzündungserscheinungen bedeutend leichter und exakter durchführbar als beim Meerschweinchen. Wir haben daher die Senfölchemosis des Kaninchens in *ausgedehnten Reihenuntersuchungen* auf ihre Eignung zur Testung antiphlogistischer Produkte untersucht.

*Versuchstechnik.*

Nach der Technik von HEUBNER u. GRABE wurde weißen Kaninchen eine 30%ige Lösung von Allylsenföl in Olivenöl in den Konjunktivalsack instilliert, und zwar im Abstand von 2 min bds. 2mal je 1 Tropfen. 15 min später begann die Behandlung

Tabelle 1. *Punktsystem zur Auswertung der Senfölversuche am Kaninchen.*

| Zu beurteilender Bereich des Auges | Entzündungskriterien | Zustand | Punktzahl |
|---|---|---|---|
| | Rötung | Schwache Rötung | 1 |
| | | Starke Rötung | 2 |
| Bindehaut | Schwellung (Chemosis) | *1. Conjunctiva tarsi sup., fornicis sup. und bulbi sup.:* | |
| | | a) Leichtes Ödem (nur leichte, ödematöse Durchtränkung der Bindehaut, keine stärkere Bindehautvorwölbung) | 1 |
| | | b) Starkes Ödem (Vorwölbung einer prallen, ödemgefüllten Bindehauttasche, die beim Aufheben des Lides sichtbar wird) | 2 |
| | | c) Sehr starkes Ödem (Vorwölbung einer prallen, ödemgefüllten Bindehauttasche im Bereich des sichtbaren Bulbusteils, bereits ohne Aufheben des Lids erkennbar; Cornea teilweise oder ganz von der geschwollenen Bindehaut verdeckt) | 3 |
| | | *2. Conjunctiva tarsi inf., fornicis inf. und bulbi inf.:* | |
| | | a) Leichtes Ödem (Zustand wie bei 1a) | 1 |
| | | b) Starkes Ödem (Zustand wie bei 1b) | 2 |
| | | c) Sehr starkes Ödem (Zustand wie bei 1c) | 3 |
| Hornhaut | Trübung | Oberflächliche (schleierartige) Hornhauttrübung | 1 |
| | | Tiefe (milchige), umschriebene Hornhauttrübung | 2 |
| | | Tiefe (milchige), umschriebene Hornhauttrübung mit Substanzverlust | 3 |
| | | Tiefe (milchige), diffuse Hornhauttrübung | 4 |
| | | Tiefe (milchige), diffuse Hornhauttrübung mit Substanzverlust | 5 |
| Regenbogenhaut | Verfärbung u. Hyperämie | Verwaschenes Aussehen, schmutzige Verfärbung und Hyperämie (Iritis) | 1 |

mit den zu untersuchenden Produkten: In viertelstündlichen Abständen wurde den Tieren insgesamt 10mal je 1 Tropfen der Azulenlösungen in das rechte und die gleiche Menge des Lösungsmittels (Olivenöl bzw. $H_2O$) zur Kontrolle in das linke Auge instilliert. Gesamtdauer der Behandlung: 2½ Std.

*Auswertung.*

Um außer der von Heubner u. Grabe allein registrierten Heilungsdauer auch die ihr nicht immer parallel verlaufende Stärke der Entzündung beurteilen und durch eine Zahl ausdrücken zu können, wurden die Versuche nach einem *Punktsystem* ausgewertet, dessen Grundlagen aus Tab. 1 ersichtlich sind. Prinzip dieser Methode war die Festlegung des jeweiligen Befundes in möglichst wenigen, in ihrer Bedeutung klar definierten Punkten. Eine stärkere Differenzierung bei der Bewertung durch Einführung höherer Punktzahlen, wie sie von Jung u. Mitarb. bei der Beurteilung der Senfölchemosis am Meerschweinchen vorgenommen wurde, haben wir absichtlich vermieden, um die Subjektivität der Beurteilung weitgehend einzuschränken. Die Eitersekretion wurde als Entzüdungskriterium nicht in die Bewertung einbezogen, weil nach Eintrocknen des Sekrets oft schwer zu entscheiden ist, ob noch eine laufende Eitersekretion vorliegt. Die bei besonders schweren Entzündungen von Bindehaut und Hornhaut häufig als Komplikation hinzukommende Iritis wurde nur mit einem Punkt bewertet, weil eine genauere Differenzierung ihrer Stärke durch die Hornhauttrübung meist erschwert ist. Sämtliche Ablesungen wurden vom gleichen Beobachter (ohne Kenntnis der getesteten Verbindungen) vorgenommen.

Die 14 Tage lang registrierten und täglich in Punkten festgelegten Entzündungsbefunde jedes Auges wurden addiert. Die Summe diente als Gradmesser für die Stärke der Entzündung. Um einen Vergleich des Entzündungsgrades beider Augen jedes Tieres zu ermöglichen und damit den Heilerfolg quantitativ zu erfassen, wurde die Gesamtpunktzahl des linken Auges (Kontrollauge) gleich 100% gesetzt und die Punktzahl des rechten Auges (Versuchsauge) auf diesen Wert bezogen.

Das beschriebene Punktsystem besitzt den Vorteil, *alle* wesentlichen Entzündungssymptome zu erfassen. Das von Küchle u. Loeser beschriebene Lidmeßgerät, das in etwas modifizierter Form auch von Brock u. Mitarb. zur quantitativen Beurteilung von Entzündungserscheinungen am Auge angewendet wurde, erwies sich dagegen nach unseren Erfahrungen in zahlreichen Vorversuchen zur zahlenmäßigen Auswertung der Senfölversuche als ungeeignet: Das Gerät erlaubt nur die Erfassung des Ödems, also des Entzündungssymptoms, das (wie unten näher beschrieben wird) im allgemeinen als erstes verschwindet, während Hornhauttrübung, Eitersekretion und Bindehautrötung meist viel länger bestehen bleiben. Außerdem ist es nicht immer zu vermeiden, daß das lockere ödematöse Gewebe des Lides bei der Messung zusammengedrückt und damit das Ergebnis beeinflußt und daß außerdem das Auge durch die zahlreichen Messungen mechanisch gereizt wird.

*Fehlergrenze der Methode.*

Normalversuche an 150 nur mit Senföl behandelten Kaninchenaugen (150 Tieren) ergaben beträchtliche *Unterschiede in der Reaktion verschiedener Tiere* (siehe Abb. 1 und Tab. 2). Die durchschnittlich erreichte Gesamtpunktzahl betrug 78, die mittlere Abweichung $\pm$ 28,2 Punkte. Der Höhepunkt der Entzündung mit einem Maximum an Schwellung und Hornhauttrübung ist meist am 2. Tag erreicht. Zuerst verschwindet die Bindehautschwellung, die im allgemeinen nur 2—4 Tage bestehen bleibt, später die Bindehautrötung und Hornhauttrübung. Die Streuung der täglichen Mittelwerte nimmt, wie besonders deutlich aus dem Wert des jeweiligen Variabilitätskoeffizienten (siehe Abb. 1) hervorgeht, gegen Ende der 14tägigen Beobachtungszeit dadurch zu, daß es bei einem Teil

der Tiere zur komplikationslosen Heilung, bei anderen dagegen durch Hinzukommen von Sekundärinfektionen mit Beteiligung tieferer Augenabschnitte (Iritis) zur Verstärkung der Entzündung und später häufig zu irreversiblen Veränderungen kommt (Hornhautnarben, völlige Vereiterung des Bulbus). Nach 14 Tagen sind die Entzündungserscheinungen bei einem Drittel der Tiere völlig abgeklungen, während sie bei anderen gelegentlich monatelang bestehen bleiben (siehe Tab. 2). Eine mehr als 14tägige Beobachtung der Entzündungssymptome bei der Auswertung der Versuche ist daher unzweckmäßig.

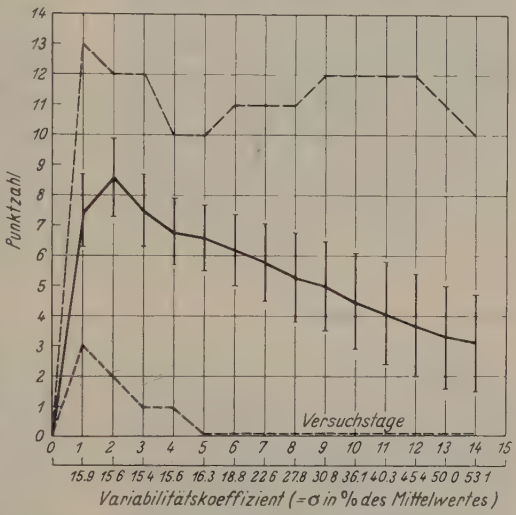


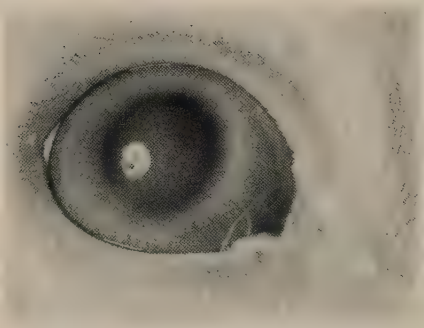

Abb. 1. Unbehandelte Senfölchemosis. Entzündungsintensität. Versuchsmaterial: 150 Kaninchen (je 1 Auge).
——— = Mittelwertskurve (durchschn. Punktzahl).
------ = obere und untere Grenze der Variationsbreite (= "range" = absolute Streuung).
I = σ (= mittlere Abweichung).

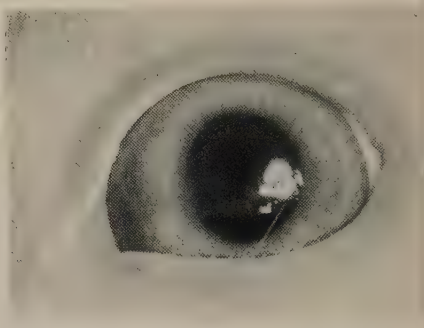
Beträchtliche *Unterschiede* zeigten sich auch trotz sorgfältigster Versuchstechnik *zwischen beiden Augen des gleichen Tieres*. So ergab die mittlere Abweichung bei Normalversuchen an 28 unbehandelten Kaninchen mit Senfölchemosis ± 23,6%, wenn die Gesamtpunktzahl eines Auges gleich 100% gesetzt wurde. Bei 7 von 28 Tieren unterschieden sich die Gesamtbefunde beider Augen um mehr als 35%, bei 2 von ihnen sogar um etwa 50%! (siehe Abb. 2 und 3). Da der Entzündungsgrad beider Augen eines Tieres anfangs meist gleich war und etwaige Differenzen erst im späteren Verlauf auftraten (siehe Abb. 3), war es nicht möglich, zu Beginn des Versuchs die beiderseits verschieden stark auf das Senföl reagierenden Tiere auszuscheiden,

Tabelle 2. *Entzündungsdauer bei der unbehandelteten Senfölchemosis.*
Versuchsmaterial: 150 Kaninchen (je 1 Auge).

| Versuchstag Nr. | Prozentsatz der abgeheilten Augen % |
|---|---|
| 1—4 | 0 |
| 5 | 1,3 |
| 6 | 2,7 |
| 7 | 3,3 |
| 8 | 7,3 |
| 9 | 10,7 |
| 10 | 16,0 |
| 11 | 20,6 |
| 12 | 22,0 |
| 13 | 28,0 |
| 14 | 32,0 |

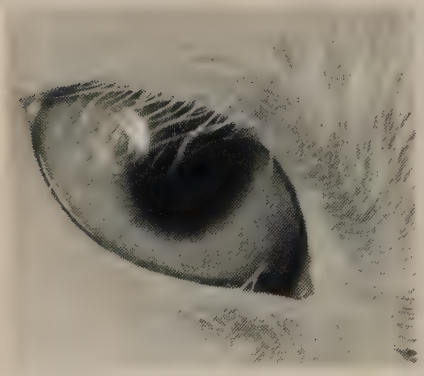
*rechts* *links*

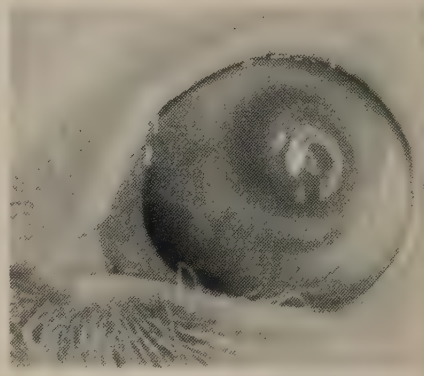




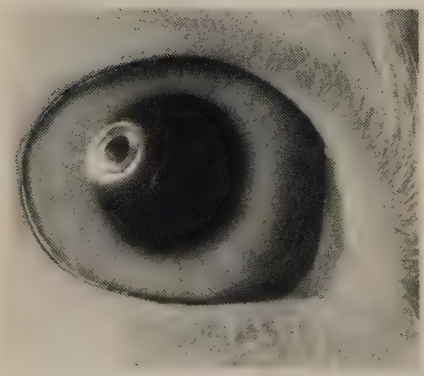
*Kan. 1685*

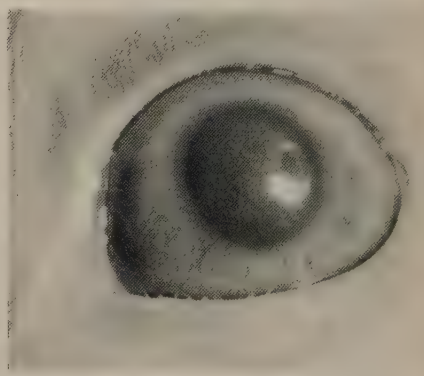
Diffusse, tiefe Hornhauttrübung (4 Punkte) Umschriebene, schleierartige Hornhauttrübung (1 Punkt)





O. B. (0 Punkte) *Kan. 1687* Diffuse, tiefe Hornhauttrübung (4 Punkte)





O. B. (0 Punkte) *Kan. 1688* Diffuse, tiefe Hornhauttrübung (4 Punkte)

Abb. 2. Unbehandelte Senfölchemosis. Verschiedene Reaktion beider Augen *eines* Tieres. Zustand am 14. Tag.

wie dies von JUNG, SCHOETENSACK u. BRUNO bei der Senfölchemosis des Meerschweinchens vorgeschlagen wird. Die Reihenfolge der Senfölein-träufelung (erst rechts, dann links) spielte bei den festgestellten Schwankungen keine Rolle.

*Prüfung der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen.*

Wir haben folgende azulenhaltigen Präparate an der Senfölchemosis des Kaninchens untersucht:

1. Oleum Chamomillae aether. german. (DRAGOCO, Holzminden); Azulengehalt: 2,5%.

2. Guajazulen (DRAGOCO, Holzminden); Azulengehalt: 95—100%.

3. Kamilleninfus (10%ig: nach den Vorschriften des DAB 6 aus Flores Chamomillae jeden 2. Tag frisch hergestellt).

4. 4 synthetische Azulene der Badischen Anilin- & Sodafabrik Ludwigshafen a. Rh.

a) *Vorversuche zur Bestimmung der lokalen Reizwirkung am Kaninchenauge.* Zur Feststellung der im antiphlogistischen Test verträglichen Konzentrationen von Ol. Chamomillae und Guajazulen wurde zunächst orientierend an 16 Kaninchen die lokale Reizwirkung am Auge bestimmt (*einmalige* Instillation von je 2 Tropfen der öligen Lösungen bzw. Originalflüssigkeiten in den Bindehautsack). Oleum Chamomillae führte unverdünnt und 50%ig in Öl zu einer starken Reizung (Bindehautrötung und -schwellung, 2—3 Tage anhaltende leichte Hornhauttrübung). In 30%iger Lösung verursachte es angedeutete, in 20- und 10%iger Lösung keine Entzündungserscheinungen mehr. Schwächer war die Reizwirkung von Guajazulen, das unverdünnt eine bereits nach 24 Std abgeklungene Bindehautrötung und -schwellung, in 50%iger Lösung eine schwache Rötung und in 10%iger Lösung keine Entzündungserscheinungen mehr zur Folge hatte.

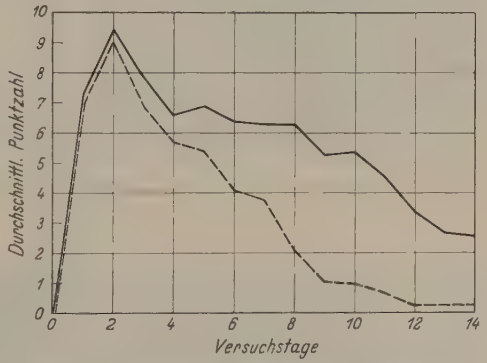
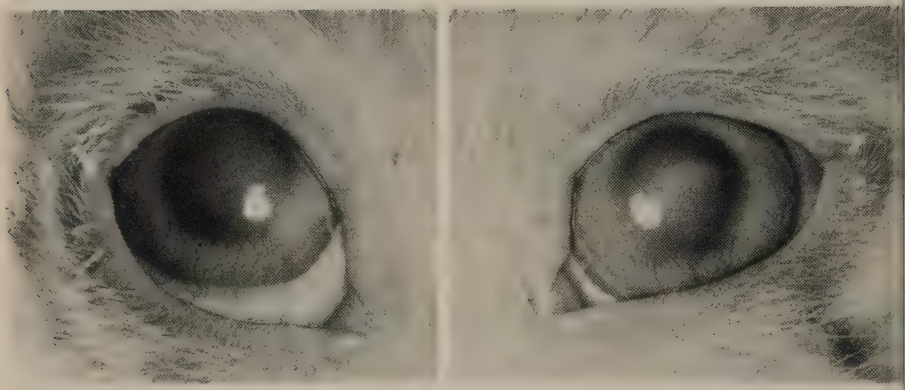



Abb. 3. Unbehandelte Senfölchemosis. Verschiedene Reaktion beider Augen *eines* Tieres. Versuchsmaterial: 7 Kaninchen (je 2 Augen).
——— = Mittelswertskurve der stärker entzündeten Augen jedes Tieres.
------ = Mittelwertskurve der schwächer entzündeten Augen jedes Tieres.

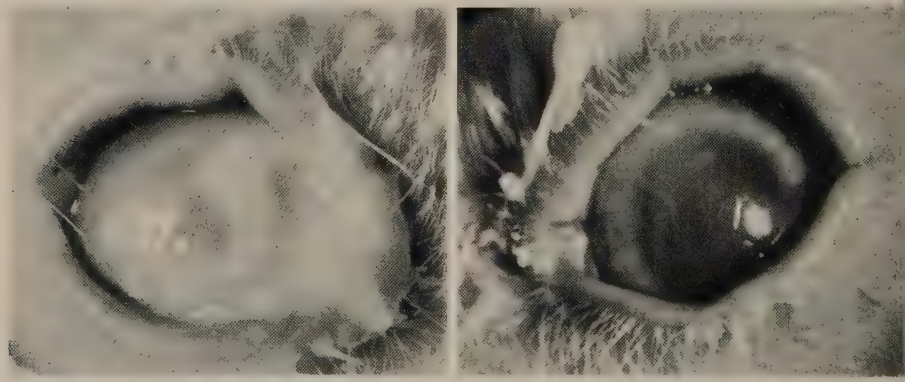
Zur Prüfung der Reizwirkung von Ol. Chamomillae und Guajazulen bei *wiederholter* Applikation erhielten 6 Tiere entsprechend der unter Nr. c) (siehe unten) beschriebenen Applikationsweise am 1. Tag 10mal 1 Tropfen und an den darauffolgenden 13 Tagen 2mal täglich je 2 Tropfen

einer 10%igen Lösung von Ol. Chamomillae bzw. Guajazulen in den Bindehautsack instilliert. Beide Produkte waren in den angewandten Konzentrationen auch bei wiederholter Applikation völlig reizlos. Eine

*Versuchsauge* (rechts) (Kamillenöl) — *Kontrollauge* (links) (Olivenöl)



*Kan. 1695* (Behandlung mit 20%igem Kamillenöl): Beiderseits tiefe, diffuse Hornhauttrübung mit beginnender Vascularisation (4 Punkte). Keine Besserung des behandelten gegenüber dem unbehandelten Auge.



*Kan. 1251* (Behandlung mit 10%igem Kamillenöl).

Starke Rötung und leichte Schwellung der Bindehaut; tiefe, diffuse Hornhauttrübung mit teilweiser eitriger Einschmelzung, Iritis. (9 Punkte).

Starke Bindehautrötung, umschriebene tiefe Hornhauttrübung (4 Punkte)

Stärkere Entzündung des behandelten Auges!

Abb. 4. *Chamazulenbehandlung der Senfölchemosis* 2½stündige Behandlung mit Oleum Chamomillae. Zustand am 14. Tag.

eventuell stärkere Reizwirkung von Chamazulen oder Guajazulen bei wiederholter Gabe kann also als Ursache für das Fehlen einer antiphlogistischen Wirkung bei der unter Nr. c) (siehe unten) angegebenen Behandlungsweise ausgeschlossen werden.

b) Bei der eigentlichen *Prüfung auf antiphlogistische Wirkung* nach der oben beschriebenen Technik von HEUBNER u. GRABE wurden 29

Tabelle 3. *Beeinflussung der Senfölchemosis am Kaninchen.*

Entzündungserregendes Produkt: 30%iges Senföl; Dauer der Azulenbehandlung: 2½ Std (in Abständen von 15 min 10mal je 1 Tropfen); Beobachtungszeit: 14 Tage.

| Tier Nr. | Produkt | Konz. des Produktes in Öl % | Azulengehalt der Lösung % | Tage bis zur Heilung | | Punktzahl | | Entzündungsgrad des Versuchsauges (Kontrollauge = 100%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | % | Mittelwert % |
| 1663 | Oleum | 20 | 0,5 | >14 | >14 | 102 | 92 | 111 | 108 |
| 1664 | Chamo- | | | 12 | 12 | 54 | 65 | 83 | |
| 1666 | millae | | | >14 | 8 | 81 | 49 | 165 | |
| 1671 | aetheric. | | | 12 | >14 | 59 | 71 | 83 | |
| 1695 | germanic. | | | >14 | >14 | 81 | 82 | 99 | |
| 321 | | 10 | 0,25 | 12 | 12 | 77 | 83 | 93 | 109 |
| 322 | | | | 5 | 4 | 17 | 8 | 213 | |
| 323 | | | | 6 | 6 | 26 | 31 | 84 | |
| 334 | | | | 4 | 12 | 19 | 69 | 28 | |
| 335 | | | | 12 | 12 | 66 | 63 | 105 | |
| 336 | | | | 13 | >14 | 93 | 83 | 112 | |
| 1251 | | | | >14 | >14 | 121 | 106 | 114 | |
| 1377 | | | | 13 | 13 | 86 | 84 | 102 | |
| 1586 | | | | >14 | >14 | 81 | 83 | 98 | |
| 1292 | Guajazulen | 10 | 10 | >14 | >14 | 76 | 75 | 101 | 90 |
| 1303 | | | | >14 | >14 | 90 | 92 | 98 | |
| 1453 | | | | >14 | >14 | 94 | 91 | 103 | |
| 1548 | | | | 8 | 8 | 41 | 46 | 89 | |
| 1550 | | | | 9 | >14 | 41 | 87 | 47 | |
| 1559 | | | | >14 | >14 | 58 | 98 | 59 | |
| 1587 | | | | >14 | >14 | 91 | 93 | 98 | |
| 1627 | | | | >14 | >14 | 66 | 68 | 97 | |
| 1697 | | | | >14 | >14 | 72 | 71 | 101 | |
| 1696 | | | | >14 | >14 | 89 | 87 | 102 | |
| 1353 | | 1 | 1 | >14 | >14 | 88 | 84 | 105 | 127 |
| 1451 | | | | >14 | 8 | 61 | 22 | 277 | |
| 625 | | | | 8 | >14 | 37 | 49 | 76 | |
| 1573 | | | | >14 | >14 | 70 | 70 | 100 | |
| 835 | | | | >14 | >14 | 89 | 117 | 76 | |

Kaninchen nach Applikation von 30%igem Senföl mit Ol. Chamomillae (20- und 10%ig) bzw. Guajazulen (10- und 1%ig) behandelt. *Dauer der Behandlung*: 2½ *Std.* In keinem Falle konnte eine signifikante entzündungshemmende Wirkung nachgewiesen werden (Einzelheiten siehe Tab. 3 und Abb. 4).

c) In Analogie zu der *längeren Behandlungsdauer* von Entzündungen in der menschlichen Therapie wurde die Methode daher in folgender Weise modifiziert: Bei gleichbleibender Behandlung am 1. Tag erhielt jedes Tier vom 2.—14. Tag 2 bzw. 5mal täglich je 2 Tropfen der zu untersuchenden Lösungen in das rechte und die gleiche Menge des

Tabelle 4. *Beeinflussung der Senfölchemosis am Kaninchen.*

Entzündungserregendes Produkt: 30%iges Senföl; Dauer der Azulenbehandlung: 14 Tage (1. Tag: in Abständen von 15 min 10mal je 1 Tropfen; 2.—14. Tag: 2mal täglich je 2 Tropfen); Beobachtungszeit: 14 Tage.

| Tier Nr. | Produkt | Konz. des Produktes | Azulengehalt der Lösung % | Tage bis zur Heilung | | Punktzahl | | Entzündungsgrad des Versuchsauges (Kontrollauge = 100%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | % | Mittelwert % |
| 389 | Kamillen- | 10%ig | unbe- | >14 | >14 | 116 | 118 | 98 | 94 |
| 390 | infus | in $H_2O$ | kannt | >14 | >14 | 85 | 94 | 90 | |
| 396 | | | | >14 | >14 | 73 | 73 | 100 | |
| 395 | | | | >14 | >14 | 54 | 66 | 82 | |
| 394 | | | | >14 | >14 | 81 | 80 | 101 | |
| 344 | Oleum | 10%ig | 0,25% | >14 | >14 | 87 | 64 | 136 | 97 |
| 342 | Chamo- | in Öl | | 10 | >14 | 49 | 88 | 56 | |
| 341 | millae aeth. | | | 8 | >14 | 48 | 107 | 45 | |
| 398 | germanic. | | | 8 | 7 | 37 | 25 | 148 | |
| 397 | | | | 5 | 9 | 17 | 55 | 31 | |
| 399 | | | | 10 | 5 | 43 | 20 | 215 | |
| 1440 | | | | >14 | >14 | 98 | 118 | 83 | |
| 1656 | | | | >14 | >14 | 79 | 93 | 85 | |
| 1608 | | | | >14 | >14 | 81 | 90 | 90 | |
| 1547 | Guajazulen | 10%ig | 10% | >14 | >14 | 73 | 72 | 101 | 96 |
| 1556 | | in Öl | | >14 | >14 | 87 | 88 | 99 | |
| 1597 | | | | >14 | >14 | 93 | 94 | 99 | |
| 1610 | | | | >14 | >14 | 81 | 97 | 84 | |
| 1624 | | | | >14 | >14 | 82 | 91 | 90 | |
| 1665 | | | | >14 | >14 | 87 | 89 | 98 | |
| 1698 | | | | >14 | >14 | 117 | 115 | 102 | |

Lösungsmittels in das linke Auge eingeträufelt. Die Auswertungstechnik wurde beibehalten. Auch bei dieser längerdauernden Behandlung konnte weder für Oleum Chamomillae (10%ig) noch für Guajazulen (10-, 1- und 0,1%ig) oder Kamilleninfus (10%ig) eine eindeutige antiphlogistische Wirkung festgestellt werden (siehe Tab. 4 und 5).

d) Mit dem Ziel, einen *weniger starken* und daher vielleicht therapeutisch besser zu beeinflussenden *Entzündungsreiz* zu setzen, wurde in einer weiteren Versuchsserie mit einer 20%igen Lösung von Allylsenföl gearbeitet bei sonst gleicher Versuchs- und Auswertungstechnik, aber etwas kürzerer Behandlungs- und Beobachtungszeit (10 Tage). Auch bei

Tabelle 5. *Beeinflussung der Senfölchemosis am Kaninchen.*

Entzündungserregendes Produkt: 30%iges Senföl; Dauer der Azulenbehandlung: 14 Tage (1. Tag: In Abständen von 15 min 10mal je 1 Tropfen; 2.—14. Tag: 5mal täglich je 2 Tropfen); Beobachtungszeit: 14 Tage.

| Tier Nr. | Produkt | Konz. des Produktes in Öl % | Azulengehalt der Lösung % | Tage bis zur Heilung | | Punktzahl | | Entzündungsgrad des Versuchsauges (Kontrollauge = 100%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | % | Mittelwert % |
| 375 | Oleum | 10 | 0,25 | 12 | 10 | 78 | 58 | 134 | 108 |
| 384 | Chamo- | | | 10 | 10 | 60 | 41 | 146 | |
| 414 | millae aeth. | | | 12 | 12 | 42 | 43 | 98 | |
| 415 | germanicum | | | 13 | >14 | 66 | 82 | 80 | |
| 547 | | | | >14 | >14 | 71 | 70 | 101 | |
| 548 | | | | >14 | >14 | 101 | 101 | 100 | |
| 455 | | | | >14 | >14 | 88 | 91 | 97 | |
| 666 | Guajazulen | 1 | 1 | >14 | >14 | 95 | 97 | 98 | 110 |
| 667 | | | | > 9 | > 9† | 59 | 41 | 144 | |
| 668 | | | | 12 | 9 | 59 | 51 | 116 | |
| 669 | | | | >14 | 11 | 70 | 70 | 100 | |
| 670 | | | | > 9 | > 9† | 40 | 43 | 93 | |
| 671 | | 0,1 | 0,1 | 9 | >14 | 31 | 41 | 76 | 87 |
| 672 | | | | >14 | >14 | 141 | 141 | 100 | |
| 673 | | | | >14 | >14 | 66 | 66 | 100 | |
| 674 | | | | >14 | >14 | 85 | 97 | 88 | |
| 675 | | | | >14 | >14 | 45 | 63 | 71 | |

Tabelle 6. *Beeinflussung der Senfölchemosis am Kaninchen.*

Entzündungserregendes Produkt: 20%iges Senföl; Dauer der Azulenbehandlung: 10 Tage (1. Tag: In Abständen von 15 min 10mal je 1 Tropfen; 2.—10. Tag: 5mal täglich je 2 Tropfen); Beobachtungszeit: 10 Tage.

| Tier Nr. | Produkt | Konz. des Produktes in Öl % | Azulengehalt der Lösung % | Tage bis zur Heilung | | Punktzahl | | Entzündungsgrad des Versuchsauges (Kontrollauge 100%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | Vers.-auge (re.) | Kontr.-auge (li.) | % | Mittelwert % |
| 701 | Guajazulen | 10 | 10 | 5 | >10 | 18 | 55 | 33 | 86 |
| 702 | | | | >10 | >10 | 68 | 68 | 100 | |
| 703 | | | | >10 | >10 | 26 | 26 | 100 | |
| 704 | | | | >10 | 9 | 51 | 41 | 124 | |
| 705 | | | | >10 | >10 | 22 | 31 | 71 | |
| 706 | | 1 | 1 | >10 | >10 | 29 | 25 | 116 | 114 |
| 707 | | | | >10 | >10 | 52 | 43 | 121 | |
| 708 | | | | >10 | >10 | 47 | 35 | 134 | |
| 709 | | | | 8 | 8 | 16 | 18 | 89 | |
| 710 | | | | >10 | >10 | 48 | 44 | 109 | |

dieser Versuchsanordnung zeigte Guajazulen (10- und 1%ig) keinerlei Wirkung (siehe Tab. 6).

e) Eine *weitere Herabsetzung der Senfölkonzentration* auf 15, 10 und 5% erwies sich wegen der sehr unsicheren und ungleichmäßigen Reizwirkung als ungeeignet.

In gleicher Weise wie Chamazulen, Guajazulen und Kamilleninfus wurden 4 synthetische Azulene der Badischen Anilin- & Sodafabrik Ludwigshafen a. Rhein an insgesamt 70 Kaninchen ebenfalls mit negativem Ergebnis untersucht.

## Diskussion.

Trotz Anwendung höchst verträglicher Azulenkonzentrationen, trotz langer Behandlungsdauer und Variation in der Stärke des Entzündungsreizes konnten wir auch für die als entzündungshemmend geltenden Azulene (Chamazulen, Guajazulen) und Kamillenzubereitungen (Ol. Chamomillae, Kamilleninfus) an der Senfölchemosis des Kaninchens keine statistisch gesicherte antiphlogistische Wirkung feststellen.

Da die entzündungshemmende Wirkung von Kamillenzubereitungen am Menschen als empirisch gesichert gelten kann, ist hieraus zu schließen, daß die Methode ebenso wie die Senfölchemosis am Meerschweinchen zur pharmakologischen Wertbestimmung von Kamillenzubereitungen sowie zur Klärung der Frage nach dem wirksamen Bestandteil der Kamille (Azulen?) nicht geeignet ist. Diese Frage bleibt also offen.

Ob sich beide Methoden *überhaupt* zur Prüfung einer antiphlogistischen Wirkung eignen, wurde von uns nicht näher untersucht, erscheint uns aber in Anbetracht der großen Streuung sowie des sehr starken und daher schwer zu beeinflussenden Entzündungsreizes unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu Brock u. Mitarb. halten wir die Brauchbarkeit der Senfölchemosis am Kaninchen zum Nachweis einer *lokalen antiphlogistischen* Wirkung durch die alten Versuche von Chiari u. Januschke *nicht* für bewiesen: Diese Autoren prüften an der Senfölchemosis des Kaninchens in ganz anderer Fragestellung die *exsudathemmende* Wirkung parenteral injizierter Calciumsalze, die sicher einen anderen Wirkungsmechanismus besitzen als die wahrscheinlich *lokal* wirkenden, jedenfalls seit alters bei der Behandlung von *Entzündungen* lokal angewandten Kamillenzubereitungen. Bei pharmakologischen Untersuchungen sollte aber für Vergleichssubstanz und zu prüfende Substanz eine völlig gleiche Versuchsanordnung getroffen werden.

Der gleiche Einwand gilt für die Methode von Brock u. Mitarb., die an der Ultraviolettentzündung des Kaninchenauges für die lokal applizierten Azulene keine und für das parenteral verabreichte Calciumchlorid eine gute ödemhemmende Wirkung feststellten und auf Grund *dieser* Versuche auf eine Wirkungslosigkeit der Azulene schließen.

## Zusammenfassung.

1. Die Senfölchemosis am Kaninchen- und am Meerschweinchenauge, gebräuchlich zum Nachweis der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen, wurde von uns auf ihre Eignung zu diesem Zweck geprüft.

2. Es wurde festgestellt, daß beide Methoden eine große Streuung besitzen, auch für beide Augen der gleichen Tiere.

3. An der Senfölchemosis des Kaninchens wurden Chamazulen, Guajazulen, Kamilleninfus sowie 4 synthetische Azulene unter Verwendung großer Tierzahlen geprüft. In keinem Falle konnte eine statistisch signifikante entzündungshemmende Wirkung festgestellt werden.

4. Die mit Hilfe beider Methoden gewonnenen positiven Befunde der bisherigen Azulenprüfer können nicht mehr als Beweis für die bisherige Auffassung gelten, daß Azulene der entzündungshemmende Bestandteil der Kamille sind.

5. Die Frage nach dem antiphlogistischen Bestandteil der Kamille bleibt offen. Gleichzeitig entfallen die Voraussetzungen für sämtliche auf Grund von Versuchen an der Senfölchemosis aufgestellten Theorien über die Beziehung zwischen chemischer Konstitution und entzündungshemmender Wirkung natürlicher und synthetischer Azulene.

## Literatur.

Albath, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 619 (1939). — Bosch, G.: Diss. München 1948. — Brock, N., J. Kottmeier, D. Lorenz u. H. Veigel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 450 (1954). — Chiari, R., u. H. Januschke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **65**, 120 (1911). — Hellriegel, W., u. W. Keudel: Strahlenther. **82**, 253 (1950). — Herz, A.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 253 (1953). — Hesse, E., W. Altner u. L. Zeppmeisel: Klin. Wschr. **1936**, 1485 und zit. nach Heubner, W., u. W. Albath: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 384 (1939). — Heubner, W., u. F. Grabe: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **171**, 329 (1933). — Janistyn, H.: Parfümerie und Kosmetik **32**, 3/4 (1951). — Jaretzky, R., u. E. Neuwald: Arch. Pharmaz. **277**, 50 (1939). — Jung, F., u. W. Schoetensack: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 112 (1950). — Jung, F., W. Schoetensack u. G. Bruno: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 1 (1951). — Jung, F., W. Schoetensack, E. Mahler u. L. Burckhard: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 255 (1951). — Kagelmacher, E.: Diss. München 1950. — Kaiser, H., u. H. Frey: Dtsch. Apotheker-Ztg. **1938**, 1385, 1402; **1939**, 882; **1942**, 155, 163. — Kohlstaedt, E., E. Staab u. W. Kesper: Die Pharmazie **1**, 218 (1946). — Kollmannsperger, G., u. H. Oettel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 228 (1954). — Krüger-Nilsen, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **174**, 197 (1934). — Küchle, H. J., u. A. Loeser: Z. exper. Med. **117**, 369 (1951). — Mahler, E.: Diss. Würzburg 1951. — Neuwald, F.: Südd. Apothekerztg. **88**, 362 (1948). — Pommer, Ch.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 74 (1942). — Roeckerath, W.: Strahlenther. **82**, 253 (1950).

Prof. Dr. H. Oettel,
Gewerbehygienisch-Pharmakolog. Institut d. BASF, Ludwigshafen/Rhein.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 486—492 (1955).

Aus der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Frhr. v. Kress).

# Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien.

III. Mitteilung.

## Funktionelles Verhalten und morphologisches Substrat unter chronischer Allylformiatvergiftung.

Von
H. Gerhartz, M. Kessel, P. Körtge und F. A. Pezold.

Mit 2 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 7. Juni 1955.)*

In den beiden vorangegangenen Mitteilungen (Kessel, Körtge u. Pezold) konnte nachgewiesen werden, daß trotz der unter protrahierter Allylformiatintoxikation eingetretenen Leberschädigung (neben anderen Veränderungen) die für die menschliche Pathologie so typischen quantitativen Veränderungen an den Serumproteinfraktionen nicht in gleichem Ausmaß in Erscheinung traten. Auch der in der Klinik als besonders empfindlich geschätzte Bromsulphaleintest zeigte nur vorübergehend einen pathologischen Ausfall. Diese Befunde warfen die Frage auf, ob die durch *chronische* Allylformiatzufuhr hervorgerufene Leberschädigung zu einer echten, dem menschlichen Krankheitsgeschehen vergleichbaren Lebercirrhose im Sinne einer bleibenden chronischen Organentzündung führt oder ob die degenerativen Veränderungen, soweit sie nicht zum Tode der Versuchstiere führen, reparabel sind im Sinne einer Restitutio ad integrum. Zum anderen erschien uns die vergleichende Heranziehung der morphologischen Leberveränderungen auch von Bedeutung, weil über eine derartig protrahierte Applikation von Allylformiat (über einen Zeitraum von 3 Monaten), wie wir sie durchgeführt haben, nach der uns bekannten Literatur bisher keine Befunde vorliegen.

### Eigene Untersuchungen.

Es wurden 20 Kaninchen nach der in den Mitteilungen I und II geschilderten Versuchsanordnung behandelt und ihre Leber histologisch untersucht. Das Ergebnis ist in Tab. 1 in Relation zur Zeit und Dosis dargestellt.

Es ergibt sich, daß eine tägliche Dosis AF von 40 mg/kg stets, von 30 mg/kg in der Hälfte der Fälle und eine Dosis von 20 mg/kg nicht zum Tode führt (Tier 12 starb an einem interkurrenten pneumonischen

Infekt). Die morphologischen Veränderungen zeigen mit fließenden Übergängen im wesentlichen *3 Stadien*, die eine feste zeitliche Gebundenheit erkennen lassen.

1. Bei der sofort oder nach mehrtägiger Gabe zum Tode führenden Dosis von 40 mg/kg kommt es in der Leber rasch zu ausgedehnten Nekrosen peripherer Läppchenbereiche. Die betroffenen Leberepithelien zeigen eine Schwellung, Trübung und

Tabelle 1. *Morphologische Veränderungen an der Kaninchenleber unter AF-Vergiftung.*

| Tier Nr. | Dosis mg/kg /die | Überlebenszeit in Tagen | Spontantod | Epithelnekrosen | leukocytäre Abwehrzone | Verbreiterung der GLISSONschen Felder | Pseudotubuli | Rundzellige Infiltration des Interstitiums |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. 130 | 100 | 0 | + | ++ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| 21 | 40 | 3 | + | +++ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| 24 | 40 | 3 | + | +++ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| 17 | 40 | 4 | + | ++++ | ∅ | + | ∅ | ∅ |
| 19 | 40 | 4 | + | ++ | + | ++ | ++ | ∅ |
| 22 | 40 | 4 | + | +++ | ++ | ++ | ∅ | + |
| 2. 26 | 40 | 6 | + | +++ | +++ | +++ | + | + |
| 27 | 30 | 17 | + | +++ | ++ | ++++ | ++ | ++ |
| 23 | 30 | 37 | + | + | + | +++ | ++ | + |
| 25 | 40 | 41 | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 30 | 30 | 65 | + | ∅ | + | ++ | + | ++ |
| 3. 31 | 30 | 163(72)[1] | | ∅ | ∅ | + | + | +++ |
| 28 | 30 | 168(78) | | ∅ | ∅ | ∅ | + | ++ |
| 20 | 30 | 196(107) | | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ++ |
| 35 | 20 | 16 | | + | ∅ | ∅ | ∅ | + |
| 18 | 20 | 96 | | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | + |
| 12 | 20 | 98 | + | + | ∅ | ∅ | ∅ | + |
| 14 | 20 | 103 | | + | + | ∅ | ∅ | ∅ |
| 15 | 20 | 103 | | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | + |
| 13 | 20 | 106 | | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | + |

[1] ( ) = Tag der letzten AF-Injektion.

Körnelung („trübe Schwellung") ihres Plasmas und enthalten oft reichlich vacuoläre fettfreie Tropfen („hydropische Degeneration") als Ausdruck einer stark vermehrten Wasseraufnahme. Stellenweise sind sie zu eosinophilen homogenen und kernlosen Schollen amorpher Struktur zusammengesintert („epitheliales Hyalin"). Es ist ganz das Bild der typischen „Koagulationsnekrose", wobei die Capillarendothelien infolge ihrer größeren Widerstandsfähigkeit im allgemeinen noch erhalten geblieben sind. Sie haben sich jedoch kontrahiert, abgerundet und aus ihrem Verbande gelöst, so daß die eingerissenen Capillarwandungen kaum noch erkennbar sind. Kleinfleckige Blutungen verwischen die Struktur des Gewebes gänzlich, wenngleich ein geringer Teil der Erythrocyten hämolysiert und ihr Farbstoff als fleckiges, körniges Pigment ausgefallen ist. Aber typische „hämorrhagische Nekrosen" auf dem Boden von Capillar- oder Gefäßthrombosen finden sich nicht.

Die stark ödematös durchtränkten GLISSONschen Felder sind inmitten der netzartigen Nekrosen kaum noch erkennbar, die Gefäßendothelien sind vielfach zerstört und die Epithelien der Gallengänge ins Lumen abgestoßen. Auch die

Abgrenzung gegen das erhalten gebliebene Parenchym ist verwaschen. Niederschläge von Gallepigment, Lockerung des Balkengefüges mit Epithelinseln und verwaschene Kernzeichnung sowie eine erheblich wechselnde Plasmaeosinophilie sind Ausdruck der Nekrobiose, während in den Läppchenzentren Zentralvenen und Capillaren zwischen den schmalen und ausgefransten Leberepithelien sperrig weitgestellt liegen und statt Erythrocyten dichte Eiweißschlieren enthalten.

Die Gewebsnekrosen erreichen um den 4. Tag ihre größte Ausdehnung und ergreifen weit über die Hälfte des Parenchyms. Gleichzeitig beginnen die ersten reparativen Vorgänge: während sich die Struktur des Interstitiums zunehmend

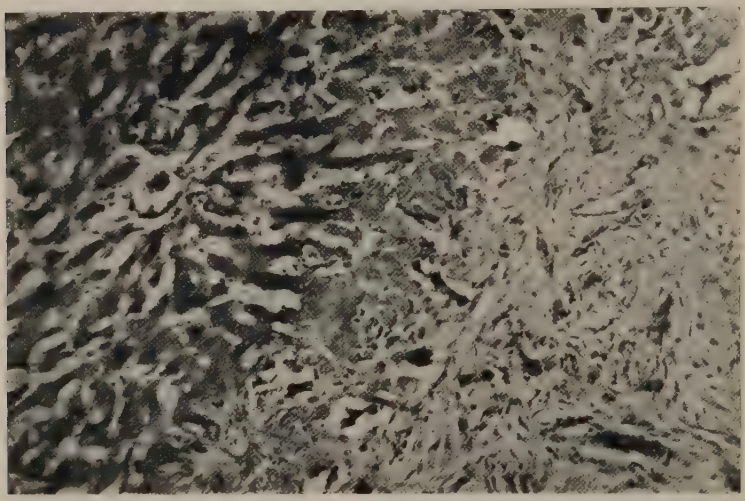


Abb. 1. *Tier* 27: Tod nach 17tägiger Behandlung mit 30 mg/kg A. F. Reparative Phase mit typischer Dreischichtung: Die unregelmäßigen Reste des Leberepithels sind kräftig eosinophil und gegen die schmale Zone der Nekrose scharf abgesetzt. Das Interstitium erscheint durch den Untergang ausgedehnter Parenchymteile erheblich verbreitert, bleibt jedoch relativ zellarm und ödematös. Zahlreiche Pseudotubuli. HE. Vergr. 120fach.

verfestigt, kommt es in den zentralen Capillaren wie auch im perivasculären Bereich der Glissonschen Felder zu Anhäufungen gelapptkerniger Leukocyten.

2. Reparative Vorgänge bestimmen ganz das Bild des zweiten Stadiums. Sie werden um den 6. Tag deutlich und erreichen in der 2.—4. Woche ihren Höhepunkt (Abb. 1). Obwohl die Injektionen des AF in gleichbleibender Höhe vorgenommen werden, nimmt die Ausdehnung der Nekrosen allmählich ab. Verflüssigung und Abtransport des coagulierten Epithelplasmas lassen weite Parenchymteile wie ausgelaugt erscheinen; das Gitterfasergerüst der Glissonschen Felder und der kollabierten Capillaren vereint sich zu einem anscheinend leeren Netzwerk, das sich in zunehmendem Maße mit fibroblastenähnlichen Zellkernen besetzt. Das Interstitium ist dadurch ex vacuo erheblich verbreitert, eine Unterscheidung zwischen Läppchenperipherie und Glissonschem Feld unmöglich geworden. Bald kommt es auch zur Aussprossung von Gallengangscapillaren, die sich als „Pseudotubuli" dem Randgebiet der Nekrosen anheften. Gleichzeitig lassen die erhalten gebliebenen Leberepithelien schärfere Zellkonturen und eine kräftigere Plasmaeosinophilie erkennen. Ihre Kerne weisen erhebliche Größenunterschiede auf und zeigen vermehrt Teilungsfiguren. Die Zentralvenen sind noch klaffend weit und leer, hingegen die zentralen Läppchencapillaren enger und enthalten neben wenigen Erythrocyten peripher

reichlich Granulocyten, darunter viele Eosinophile als Zeichen der zunehmenden Demarkierung. Auch die zentralen Capillarendothelien beginnen nun reaktiv zu wuchern. Das mikroskopische Bild erhält dadurch eine typische Dreischichtung: Gitterartiges Interstitium — schmale nekrotische Randzone — regenerierendes Parenchym, und verleitet durch seine unregelmäßige Epithelanordnung („Pseudolobuli") zu einem Vergleich mit der Lebercirrhose.

3. Nach 2 Monaten sind die reaktiven Vorgänge im wesentlichen abgeschlossen. Das Parenchym hat seine alte Ausdehnung wieder erreicht. Die Verbreiterung der Glissonschen Felder ist kaum noch erkennbar, sie bildet sich im Laufe der weiteren

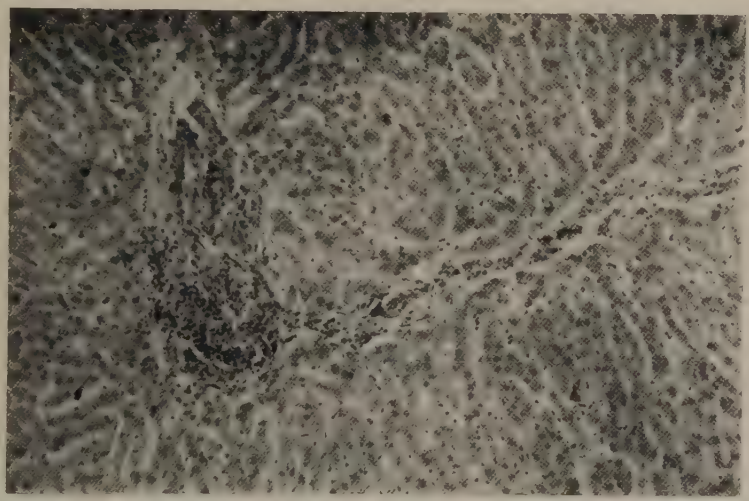


Abb. 2. *Tier* 13. Weitgehende morphologische Reparation des Parenchyms. Nur eine rundzellige Infiltration und schmale Verkettung der Glissonschen Felder sowie die Retothelreaktion und eine geringe Unregelmäßigkeit der Balkenanordnung erinnern noch an die überstandene Parenchymdegeneration. HE. Vergr. 120fach.

Wochen restlos zurück. Die jetzt noch überlebenden, niedriger dosierten Tiere zeigen nur selten Nekrobiosen von Leberepithelien. Einzig finden sich noch angedeutet eine schwache Verkettung der Glissonschen Felder durch lange schmale Ausläufer, eine stellenweise netzartige Balkenstruktur des Leberepithels und eine schwache intralobuläre Retothelreaktion, sowie eine geringe Vermehrung der Gallengangscapillaren als Ausdruck der chronischen Organschädigung. Hingegen ist die rundzellige Infiltration des Interstitiums noch lange deutlich. Begann sie Ende der ersten Woche als spärliche perivasculäre, leukocytäre Ansammlung, so wandelt sie sich mit Abschluß der 2. Phase allmählich zu einer dichten, rein lymphoidzelligen Infiltration. Solcherart ist sie in mäßigem Umfange auch noch 3 Monate nach Abschluß der Injektionen nachweisbar. Sie ist jedoch rein zellig und frei von jeglicher Faserneubildung.

In den *Lungen* bewirkt AF bei subcutaner Injektion häufig eine erhebliche Hyperämie mit Alveolarödem und kleinfleckigen Blutungen bis zu hämorrhagischen Bronchopneumonien, an den *Nieren* zuweilen eine erhebliche Schädigung des Kanälchenepithels mit Cylindrurie und einer mäßigen Glomerulitis. Auch im *Herzmuskel* kommt es gelegentlich zu feinfleckigen Fasernekrosen und einem zellreichen interstitiellen Ödem.

## Besprechung der Ergebnisse.

Die in der akuten Phase unter AF verstorbenen Tiere zeigen morphologisch das Bild einer schweren toxischen Leberschädigung. Bei den überlebenden Tieren, welche mit fortlaufenden täglichen Dosen von 30 mg/kg/die AF behandelt wurden, setzen die quantitativen *Verschiebungen der Serumeiweißkörper* mit Beginn der reparativen Phase (etwa zweite Vergiftungswoche) ein und erstrecken sich im allgemeinen über die gesamte Regenerationszeit (etwa 2 Monate). Die stärkste Albuminverminderung liegt in der 3.—4. Versuchswoche. Typisch ist die „Unruhe der $\beta$-Globulinfraktion". Ihr zeitliches Auftreten ist jedoch nicht zu den histologischen Veränderungen in Beziehung zu setzen. Eine regelmäßige und mit dem Krankheitsverlauf zunehmende $\gamma$-Globulinvermehrung wird nicht beobachtet.

Der *Bromsulphaleintest* zeigt erst auf dem Höhepunkt der reparativen Phase einen pathologischen Verlauf. Nach spätestens 3 Monaten normalisiert er sich wieder. Trotz fortgeführter AF-Zufuhr erscheinen im histologischen Bild nach Ablauf von 2 Monaten die reaktiven Vorgänge im wesentlichen als abgeschlossen. Nach Absetzen der AF-Applikation kommt es zu einer fast vollständigen Restitutio ad integrum, sowohl im histologischen Bild als auch bezüglich des Bromsulphaleintestes und der serumelektrophoretischen Befunde.

Die *morphologischen Veränderungen* bei der experimentellen AF-Intoxikation sind hinreichend bekannt, so durch Eppinger, Kaunitz u. Popper für den Hund, durch Benda, Benstz, Eppinger, Heinemann, sowie Küchmeister für die Ratte, durch Heinemann und Terbrüggen für das Kaninchen und durch Popper für den Salamander. Sie stimmen im wesentlichen überein. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Deutungen Eppingers durch spätere Autoren nicht in allen Punkten bestätigt wurden (Roessle, Heinemann, Fleckenstein, Terbrüggen). Sowohl bei subcutaner wie bei intraperitonealer- oder intraportaler Injektion entsteht durch AF in erster Linie auf Grund eines in der Struktur und Funktion des spezifischen Parenchyms gelegenen lokalisierenden Faktors (Pathoklise) eine erhebliche degenerative Schädigung des Leberepithels. Entsprechende Feststellungen konnten auch wir bei unseren nach AF-Intoxikation vorzeitig zugrunde gegangenen Tieren machen.

Nach Eppinger entwickelt sich bei *chronischer* Darreichung von AF dort, wo es zu einer Zerreißung der Capillaren und zum Auftreten sogenannter Blutseen mit diffusen Nekrosen aus einem Gemenge isolierter Leberepithelien, Erythrocyten und Kupfferschen Sternzellen gekommen ist, *bereits nach verhältnismäßig kurzer Zeit* eine *an die menschliche atrophische* Laennecsche *Cirrhose erinnernde Bindegewebswucherung*. Popper spricht von einem durch Faserzerstörung zur Cirrhose führenden Mesenchymschaden. Er fand nach 14 Tagen bereits Ausheilungsformen mit „fibröser Narbenbildung" und nach 6—8 Wochen Bilder im Sinne einer Cirrhose. Auch Heinemann schildert nach 4 Wochen die Ausheilung periportaler Nekrosen unter Neubildung von Bindegewebe und Gallengangswucherungen, die sie jedoch dem Bilde der biliären Cirrhose zuordnet.

Die von Eppinger, Popper und Heinemann gegebenen Darstellungen cirrhoseähnlicher Gewebsumbildungen bei *chronischer* AF-Intoxikation

stimmen morphologisch wie zeitlich mit unseren Beobachtungen überein: Im Verlauf der 2.—4. Woche kommt es zu einer erheblichen Verbreiterung des Interstitiums mit netzartigen Verbindungen, zur Ausprägung von Pseudolobuli, sowie zur Aussprossung zahlreicher Pseudotubuli. Dises Bild darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß die Pseudolobuli nur durch sektorartige Epithelnekrosen und die Verbreiterung der Glissonschen Felder durch den Kollaps des Parenchyms und ein kompensatorisches Ödem verursacht sind. Wie die Bindegewebsfärbungen zeigen, liegt eine echte Faserneubildung nicht oder nur andeutungsweise vor. Es fehlen auch ganz die Ansammlungen fibroblastischer Zellkerne und die dichten Capillarsprossungen. Vielmehr handelt es sich um ein ausgesprochen zell- und gefäßarmes, fast leeres Gitterfasernetz, dem die Kriterien der „Narbenbildung" nicht zugestanden werden können. Letztlich muß der weitere Verlauf als Beweis dafür angesehen werden, daß nur eine vorübergehende reparative Phase mit der Fähigkeit zur Restitutio ad integrum vorliegt. Nach einer täglichen AF-Intoxikation von 30 mg über 72—107 Tage sind nach 5—7 Monaten wesentliche Narbenbildungen nicht mehr erkennbar. Einzig erinnern noch die mehr oder minder ausgeprägten lymphoiden Infiltrate der normal breiten Glissonschen Felder und zuweilen zart ausgezogene Verbindungsbrücken des Interstitiums an die überstandene Parenchymschädigung. Die Beobachtungszeit der in der Literatur geschilderten experimentellen Untersuchungen mit AF geht jedoch über einen Zeitraum bis zu 5 Wochen nicht hinaus. Sie umfaßt also nur die Veränderungen der zweiten reparativen Phase, nicht jedoch die dritte Phase der Ausheilung. Versteht man unter einer Lebercirrhose nicht nur eine degenerative Schädigung, sondern darüber hinaus eine chronische Entzündung des Organs mit Vermehrung des perilobulären Interstitiums, einem infiltrativen Wachstum gegen das Parenchymepithel und einer Störung des intrahepatischen Kreislaufs, so besteht keine Berechtigung mehr, bei den durch chronische AF-Intoxikation hervorgerufenen Veränderungen von einer experimentell erzeugten Cirrhose zu sprechen, insbesondere auch, da wir bei keinem unserer Tiere Zeichen einer irreparablen Pfortaderstauung fanden.

Unsere Befunde bestreiten jedoch nicht die Möglichkeit einer experimentell erzeugbaren Cirrhose überhaupt; sie dürften vielmehr von den Narbenbildungen auf Grund zentraler Nekrosen mit periphlebitischer Cirrhosierung, wie sie z. B. durch chronische Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation erzeugt werden können, oder auch von den Narbenbildungen im Gefolge infarktähnlicher Nekrosen auf dem Boden mechanischer oder thrombotischer Kreislaufstörungen (organische Substanzen, Essigsäure) streng zu trennen sein.

**Zusammenfassung.**

An Kaninchen wurden bei chronischer Allylformiatvergiftung die morphologischen Leberveränderungen mit früheren Befunden über Verschiebungen der Serumeiweißfraktionen und über Änderungen der Leberfunktion mittels Bromsulphaleintest verglichen.

Durch chronische AF-Intoxikation lassen sich am Versuchstier keine morphologischen Veränderungen hervorrufen, die als „experimentell erzeugte Lebercirrhose" bezeichnet werden dürfen.

Aus dem Verhalten der Kaninchenleber unter chronischer AF-Intoxikation lassen sich weder funktionsdiagnostisch noch anatomisch Analogieschlüsse auf die Vorgänge bei der Cirrhoseentwicklung in der menschlichen Leber ziehen. Diese Versuchsanordnung eignet sich daher in dieser Beziehung nicht als Modellversuch.

**Literatur.**

Benstz, W.: Zur membranstabilisierenden Antihistamin-Wirkung bei der experimentellen Leberschädigung durch Allylformiat. Z. exper. Med. **118**, 593 (1952). — Eppinger, H., H. Kaunitz u. H. Popper: Seröse Entzündung. Wien: Springer 1935. — Gerhartz, H.: Über die Leberveränderungen bei einer Essigsäurevergiftung. Virchows Arch. **316**, 456 (1949). — Kessel, M., P. Körtge u. F. A. Pezold: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 123 (1954); **223**, 127 (1954). — Küchmeister, H., H. H. Schumacher, G. Herrnring u. U. v. Pentz: Die Wirkung des ACTH auf die Reaktionsweise der Leber nach Allylformiatvergiftung. Z. exper. Med. **120**, 215 (1953). — Popper, H.: Über experimentelle Hepatitis. Virchows Arch. **298**, 574 (1937). — Roessle, R.: Über die seröse Entzündung. Virchows Arch. **311**, 252 (1943).

Außerdem siehe Literatur der Mitteilungen I und II.

Dr. H. Gerhartz, Berlin, Medizin. Klinik d. Fr. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 493—504 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
und dem Hauptlaboratorium der Schering A. G., Berlin-West.

# Die Bedeutung der N-Substitution bei der adrenergischen Übertragung.

Von
H. Langecker und H. Friebel.

*(Eingegangen am 4. Juli 1955.)*

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Frage von Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung bei Abwandlung der Nor-Adrenalinreihe, insbesondere hinsichtlich Länge und Anordnung der Gruppierung zwischen Benzolring und Stickstoff, sowie hinsichtlich Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen im Kern (vgl. Übersichtsreferate: Graubner). Hingegen ist die Bedeutung der N-Substitution für die strukturellen Erfordernisse bei der adrenergischen Übertragung noch vielfach unklar. Es wurden daher in der vorliegenden Arbeit Abwandlungen der N-Substitution (ein bzw. zwei Alkyle, Alkohole, Äther, Ersatz der Aminogruppe durch basische Ringe, innere Anhydride) in der Adrenalin- und Adrenalonreihe, sowie in der Reihe der α-(3,4-Dioxy-phenyl)-β-aminopropanole, α-Amino-propionyl-brenzkatechine, α-Aminobutyryl-brenzkatechine, α-(3-Methoxy-4-oxyphenyl)-β-aminoäthanole, Amino-acetoguajakole, α-(3,4-Dimethoxyphenyl)-β-aminoäthanole und der Aminoacetoveratrole auf sympathicomimetische Eigenschaften untersucht[1].

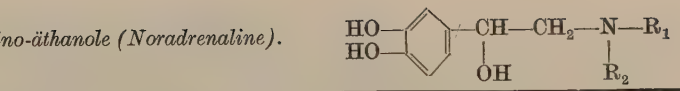
Die Toxicität wurde an der Maus als LD 50 nach intravenöser Verabreichung (Injektionszeit 5 min, Beobachtungszeit 24 Std) ermittelt. Von den erregenden Wirkungen wurde die pressorische am Blutdruck der mit Pernocton narkotisierten Katze, ferner die Wirkung am isolierten Kaninchenuterus unter Benutzung entsprechend adrenalinempfindlicher Stücke, von den lähmenden die depressorische gleichfalls am Katzenblutdruck und die asthmolytische am allergischen Asthmaanfall des Meerschweinchens (Methode von Friebel u. Basold) geprüft. Ferner wurde das Verhalten am Straub-Herzen untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tab. 1—5 zusammengestellt.

*I. N-substituierte α-(3,4-Dioxy-phenyl)-β-amino-äthanole (Tab. 1).*

Die Giftigkeit (vgl. Spalte 1 und 2 der Tab. 1) in dieser Reihe nimmt mit der Länge der Alkylkette am Stickstoff ab. Die Dimethylverbindung III ist weniger giftig als die Monomethylverbindung II, sie ist jedoch nach II die giftigste. Substitution mit Alkanolen führt bei den geradkettigen zu wesentlich giftigeren Verbindungen (X und XIV) als die Substitution

[1] Die Verbindungen wurden im Hauptlaboratorium der Schering A. G. von Herrn Dr. H. Pfeiffer und Herrn F. Elster hergestellt.

Tabelle 1. *N-substituierte α-(3,4-Dioxy-phenyl)-β-amino-äthanole (Noradrenaline).*



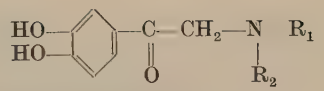
| Nr. | $R_1$ | $R_2$ | Toxicität: Maus LD 50 i. v. mg/kg | Toxicität: Verhältnis Substanz-/Nor-Adrenalin | Blutdruck Katze γ/Tier: Steigerung | Blutdruck Katze γ/Tier: Senkung | Glatte Muskulatur: Uterus Kanin Erregende Adrenalin Konz. = 1 | Glatte Muskulatur: Asthmolyse Mol. Grenz-Konzentration Inhal. | Straub-Herz Grenzkonzentration Inotropie: Pos. | Straub-Herz Grenzkonzentration Inotropie: Neg. | Literatur |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | H | H | 0,55 | | 0,5 | | 2 | 1/2000 | | | |
| II | H | $CH_3$ | 0,34 | 0,6 | 2,0 | 0,2—1 | 1 | 1/4000 | | | |
| III | Methyl | Methyl* | 6,75 | 13,0 | | 5—25 | 200 | 1/500 | $10^{-6}$ | | |
| IV | H | Äthyl | 19,0 | 40,0 | 400 | 5—50 | 50 | 1/32000 | $10^{-8}$ | | 3, 7, 8, 10, 13 |
| V | H | i-Propyl | 122,0 | 240,0 | | 0,2—2000 | 2000 | 1/32000 | $10^{-11}$ | | 1, 2, 3, 4, 6a, 7, 8, 9a, 10 |
| VI | H | n-Butyl | 97,0 | 199,0 | | 5—400 | > 5000 (Hemm.) | 1/1000 | $10^{-6}$ | | 2, 3, 1, 7, 8, 11 |
| VII | H | i-Amyl | 89,0 | 178,0 | | 10000 | > 1000 (Hemm.) | 1/8000 | $10^{-11}$ | | |
| VIII | H | n-Octyl | 109,2 | 218,0 | | 10000 | > 500 (Hemm.) | 1/100 unwirks. | $10^{-7}$ | | |
| IX | H | 3-Morpholino-propyl-(1) | 194,0 | 388,0 | | 1,0 lang anhalt. | > 100 | 1/4000 | $10^{-10}$ | | |
| X | H | Oxyäthyl | 27,0 | 54,0 | 1000 | 2—200 | 200 | 1/16000 | $10^{-12}$ | | 2, 12 |
| XI | Oxyäthyl | Oxyäthyl* | 215,0 | 430,0 | | 100 | > 800 | 1/250 | $10^{-6}$ | | |
| XII | H | 2-Oxypropyl-(1) | 610,0 | 1220 | | 1—200 | > 1000 | 1/1000 | $10^{-7}$ | | 2, 12 |

*Tabelle 1.* (Fortsetzung).

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| XIII | H | 1-Oxypropyl-(2)* | 265,0 | 530,0 | | 10 | 2000 | 1/1000 | $10^{-8}$ | |
| XIV | H | 1-Oxypropyl-(3)* | 13,0 | 26,0 | | 1,0 lang anhalt. | > 2000 (Hemm.) | 1/32000 | $10^{-6}$ $10^{-3}$ | |
| XV | H | 1-Methoxyäthyl-(2) | 610,0 | 1220 | | 1—20 | > 800 (Hemm.) | 1/4000 | $10^{-8}$ | |
| XVI | H | 3-Methoxypropyl-(1) | 168,0 | 336,0 | | 2,0 | > 1000 | 1/100 unwirks. | $10^{-6}$ | |
| XVII | H | Isopropoxyäthyl* | 53,75 | 104,0 | | 1,0 | > 800 | 1/2000 | $10^{-10}$ | |
| XVIII | H | 3-i-Propoxypropyl-(1) | 95,0 | 190,0 | | 1,0 | > 250 (Hemm.) | 1/250 | $10^{-6}$ | |
| XIX | H | n-Octyloxyäthyl* | 107,0 | 214,0 | | 1,0 | > 1000 | 1/100 | $10^{-6}$ $10^{-4}$ | |
| | | | | | | | | | | |
| XX | Pyrrolidino | | 86,0 | 172,0 | 500 | | 200 > 2000 | 1/1000 | $10^{-7}$ | |
| XXI | Piperidino | | 77,0 | 154,0 | | 5—2000 | > 2000 | 1/500 | $10^{-9}$ | |
| XXII | Morpholino | | 170,0 | 2400 | | 2—1000 | > 1000 | 1/4000 | $10^{-8}$ | 8 |
| XXIII | Hexamethylenimino | | 79,0 | 158,0 | 5—10000 | | > 200 | 1/1000 | $10^{-4}$ | |

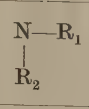
* Liegt als Öl vor, mit unsicheren Reinheitskriterien.

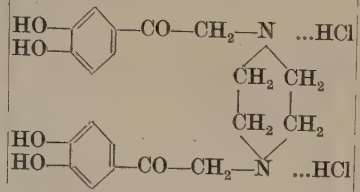
Tabelle 2. *N-substituierte Amino-acetobrenzcatechine.*




| Nr. | $R_1$ | $R_2$ | Toxicität: Maus LD 50 i. v. mg/kg | Toxicität: Verhältnis Keton/Alkohol | Blutdruck Katze γ/Tier: Steigerung | Blutdruck Katze γ/Tier: Senkung | Glatte Muskulatur: Uterus Kanin Erregende Adrenalin-Konz. = 1 | Glatte Muskulatur: Asthmolyse Mol. Grenzkonzentration Inhal. | Straub-Herz Grenzkonz. Inotropie: Pos. | Straub-Herz Grenzkonz. Inotropie: Neg. | Literatur |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| XXIV | H | H | 296 | 540 | 20 | | 400 | 1/100* | $10^{-10}$ | | |
| XXV | Methyl | H | 275 | 810 | 500 | 20—100 | 500 | 1/250* | $10^{-6}$ | | 4, 11, 13 |
| XXVI | Methyl | Methyl | 430 | 60 | | 5000 | 250* | 1/100* | $10^{-6}$ | | |
| XXVII | Äthyl | H | 44—122 | 42,5 | 1000 | 2—100 | 200 | 1/250* | $10^{-7}$ | | |
| XXVIII | i-Propyl | H | 215 | 1,75 | | 200—2000 | > 2000 | > 1/100 | $10^{-6}$ | | 11 |
| XXIX | n-Butyl | H | 138 | 1,4 | 2500 | | < 1000 | 1/250* | $10^{-8}$ | | |
| XXX | i-Amyl | H | 89,6 | 1,0 | | | > 1000 | 1/250* | $10^{-9}$ | | |
| XXXI | n-Octyl | H | 127 | 1,02 | | | > 2000 | 1/250* | $10^{-6}$ | | |
| XXXII | 3-Methyl-pent-1-inyl-(3) | H | 610 | | | 10 | > 1000 | 1/100* | $10^{-4}$ | | |
| XXXIII | 3-Morpholino-propyl-(1) | H | 239 | 1,2 | 50 | 100 | 2000 | 1/100* | $10^{-4}$ | | |
| XXXIV | Oxyäthyl | H | 388 | 14,4 | | 5—2000 | 1000 | 1/250* | $10^{-7}$ | | |
| XXXV | Oxyäthyl | Oxyäthyl | 610 | 2,8 | | 20—10000 | 100* | 1/100* | $10^{-5}$ | | |
| XXXVI | 2-Oxypropyl | H | 680 | 1,11 | | | < 500 | 1/250* | $10^{-6}$ | | |
| XXXVII | 1-Oxypropyl-(2) | H | 467 | 1,87 | 10,000 ohne Wirk. | | > 1000 | 1/100* | $10^{-6}$ | | |
| XXXVIII | 1-Oxypropyl-(3) | H | 388 | 32,0 | | 10—10000 | > 1000 | 1/100* | $10^{-11}$ | | |
| XXXIX | 1,3-Dioxypropyl | H | 53,0 | | 100—5000 | | 500 | 1/100* | $10^{-6}$ | | |
| XL | 1-Methoxyäthyl | H | 610 | 1,0 | | 100-10000 | 250 | 1/100* | $10^{-7}$ | | |
| XLI | 3-Methoxy-propyl-(1) | H | 177 | 1,0 | | 50—100 | > 200* | 1/100* | $10^{-5}$ | | |

*Tabelle 2.* (Fortsetzung).

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| XLII | Isopropoxy-äthyl | H | 188 | 3,3 | —100 ohne Wirk. | | 100* | 1/100* | $10^{-7}$ |
| XLIII | Isopropoxy-propyl | H | 134 | 1,4 | 50—100 | 50—100 | 250* | 1/100* | $10^{-5}$ |
| XLIV | Octyloxy-äthyl | H | 97 | 1,0 | | 50 | > 1000 Hemm. | 1/250* | $10^{-4}$ ohne Wirkung |
| XLV | 3-Octyloxy-propyl-(1) | H | 152 | 0,78 | | 65 | | 1/100* | $10^{-5}$ |
| XLVI | Cyclohexyloxy-äthyl | H | 95,6 | | 100 ohne Wirk. | | > 1000 | 1/100* | $10^{-3}$ |
| XLVII | 3-Cyclohexyloxy-propyl-(1) | H | 123 | | | 50 | > 1000 Hemm. | 1/100* | $10^{-6}$ $10^{2}$ |
| |  | | | | | | | | |
| XLVIII | Piperidino | | 43 | 0,5 | | 2—50 | > 1000 | > 1/100 | $10^{-11}$ |
| IL | Pyrrolidino | | 39 | 0,5 | 200—1000 | 2—50 | > 1000 | > 1/100 | $10^{-5}$ |
| L | Morpholino | | 860 | 0,7 | | 2000 | 250* | 1/250 | $10^{4}$* |
| LI | Hexamethylenimino | | 43 | 0,51 | | 30000 | 100* | > 1/250 | $10^{-5}$ |
| LII | N,N′-Bis-(3,4-dioxyphenacyl)-piperazin-HCl | | 71,5 | | | 125 | 400* | 1/500 | $10^{-5}$* |



* = unwirksam.

mit verzweigten Alkanolen (XII und XIII). Einführung von 2 Äthanolen liefert eine Verbindung geringerer Toxicität (XI) als die einfache Substitution mit Alkohol (X). Die Verätherung der substituierenden Alkohole liefert relativ wenig giftige Verbindungen (XV, XVI. XVII, XVIII und XIX), XV ist die ungiftigste Verbindung. Drei der untersuchten Substanzen, bei denen der Stickstoff einem Ring angehört, haben vermutlich zufällig etwa die gleiche Toxicität (XX, XXI und XXIII), XXII ist sehr wenig giftig. I wirkt nur pressorisch, II und IV je nach Dosis pressorisch oder depressorisch. Von V an kommen nur depressorisch wirkende Verbindungen vor, wobei V am stärksten wirkt. Mit zunehmender Kettenlänge der Alkyle am Stickstoff nimmt die depressorische Wirkung ab. Die Dimethylverbindung III wirkt nur depressorisch und wesentlich schwächer als II. Besonders anhaltend ist die depressorische Wirkung von IX.

Die mit Alkoholen und Äthern am Stickstoff substituierten Verbindungen wirken alle beachtlich depressorisch. Unter den Substanzen, die den Stickstoff in einem Ring enthalten, kommen pressorische und depressorische Wirkungen nebeneinander vor. Das Verhältnis von Toxicität zur depressorischen Wirkung ist trotz der großen Unterschiede in der Toxicität bei den einzelnen Verbindungen ähnlich. Alle pressorisch wirksamen Verbindungen wirken auch erregend auf den Kaninchenuterus, die übrigen sind auch in großen Dosen nicht uterus-erregend, sondern sogar hemmend wirksam. Die Beseitigung des allergischen Asthmaanfalls gelingt mit fast allen Stoffen der Tab. 1. Die asthmolytische Aktivität zeigt weder zur Toxicität noch zur Blutdruckwirkung enge Beziehungen. Stark wirksam sind neben I, II und III vor allem Verbindungen mit verzweigten Ketten am Stickstoff (V und VII). Auch unter den mit Alkohol oder Äther am Stickstoff substituierten sind sehr wirksame Stoffe (X, XIV, XV und XVII). Die Morpholino- und Morpholinopropyl-Verbindung (IX, XXII) sind stark wirksam, III und XI wirken schwächer als die einfach substituierten II und X. Alle Substanzen der Tab. 1 wirken am Straub-Herzen in Konzentrationen, die das 100 bis 1000fache der wirksamen Adrenalin-Konzentration betragen, positiv inotrop. Eine klare Beziehung zur Toxicität läßt sich nicht erkennen. Eine positiv chronotrope Wirkung ist nur ausnahmsweise vorhanden.

### *II. N-Substituierte Amino-acetobrenzkatechine (Tab. 2).*

Tab. 2 enthält eine Reihe ähnlich am Stickstoff substituierter Verbindungen, wie sie in Tab. 1 dargestellt sind, mit dem Unterschied, daß der Grundkörper das Aminoacetobrenzkatechin ist. Die Toxicität (vgl. Spalte 1 und 2 der Tab. 2) ist in dieser Reihe generell geringer als bei den Homologen der Tab. 1. Der Unterschied ist besonders deutlich bei den ersten Gliedern der Reihe (XXIV, XXV und XXVII) und nimmt mit

Verlängerung der Alkyl-Substitutionen am Stickstoff ab. Auch die Dimethylverbindung XXVI ist sehr wenig giftig. Einführung von Alkohol am Stickstoff bewirkt einen deutlichen Unterschied in der Toxicität (z. B. XXXVIII gegenüber XIV), Substanzen, die den Stickstoff in einem Ringsystem tragen (XLVIII, IL, Lund LI), sind etwa halb so giftig wie die homologen Arterenole. Pressorische Wirkungen zeigen auch in dieser Reihe nur die Glieder mit kurzen Alkylen am Stickstoff (XXIV, XXV, XXXVII und überraschenderweise XXXIII). Alle anderen haben nur depressorische Wirkungen. XXXIV und LII zeigen eine schwache asthmolytische Wirkung, alle übrigen Verbindungen waren als n/100 bzw. n/250 molare Lösung wirkungslos. Erregende Wirkungen am Kaninchenuterus fanden sich nur bei den Anfangsgliedern (XXIV, XXV und XXVII), sonst tritt sogar gelegentlich Hemmung der Eigenrhythmik auf. Das Verhalten am STRAUB-Herzen ist das gleiche wie bei den Stoffen der Tab. 1.

### *III. Cyclische Anhydride von N-Oxy-alkyl-nor-adrenalinen (Tab. 3).*

Bei den in Tab. 3 aufgeführten Substanzen wird das Anhydrid des N-Oxyäthyl-noradrenalin (X) durch Substitution mit Methyl bzw. Dimethyl bzw. Hydroxymethyl im Morpholinring abgewandelt. Auffallend ist die hohe

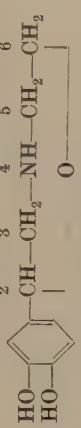
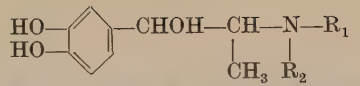



Tabelle 3. *Cyclische Anhydride von N-Oxy-alkyl-nor-adrenalinen.*

| Nr. | Substanz | Toxicität Maus LD 50 i. v. mg/kg | Blutdruck Katze γ/Tier | | Glatte Muskulatur | | STRAUB-Herz Grenzkonzentration Inotropie | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Steigerung | Senkung | Uterus Kanin Erregende Adrenalin-Konz. = 1 | Asthmolyse Mol. Grenzkonzentration Inhal. | Pos. | Neg. |
| LIII | 2-(3',4'-Dioxyphenyl)-morpholin | 13 | 5—50 | | 10 | 1/1000 | $10^{-7}$ | |
| LIV | 5-Methyl „ | 215 | 100 | | 1000 | 1/250 | | $10^{-11}$ |
| LV | 6-Methyl „ | 134 | | 2—100 | 100—150 | 1/100* | | $10^{-4}$ |
| LVI | 3,6-Dimethyl „ | 225 | | | > 1000 | 1/250 | | $10^{-6}$ |
| LVII | 2-Oxy-3-methyl „ | 430 | | 2—50 | > 1000 | 1/100* | | $10^{-3}$ |

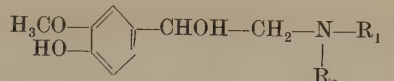
* = unwirksam.

Tabelle 4. *N-substituierte α-(3,4-Dioxy-phenyl)-β-aminopropanole (A).*



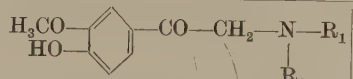
| Nr. | $R_1$ | $R_2$ | Toxicität: Maus LD 50 i. v. mg/kg | Toxicität: Verhältnis Propanole / Äthanole | Blutdruck Katze γ/Tier: Steigerung | Blutdruck Katze γ/Tier: Senkung | Glatte Muskulatur: Uterus Kanin Erregende Adrenalin-Konz.=1 | Glatte Muskulatur: Asthmolyse Mol. Grenzkonzentration Inhal. | Straub-Herz Grenzkonzentration Inotropie: Pos. | Straub-Herz Grenzkonzentration Inotropie: Neg. | Literatur |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LVIII | i-Propyl | H | 112 | 0,9 | | 5 | 100* | 1/16000 | $10^{-7}$ | | 5, 8, 9 |
| LIX | Methoxy-aethyl | H | 173 | 0,28 | | 1 | > 1000 | 1/2000 | $10^{-9}$ | | |
| | $R_1$—N—$R_2$ | | | | | | | | | | |
| LX | Morpholino | | 305 | 0,25 | | | > 1000 | 1/100 | $10^{-7}$* | | |
| | *N-substituierte α-Amino-propionyl-brenzkatechine (B).* | | | | | | | | | | |
| | | | Substanz / Propanole | | | | | | | | |
| LXI | Isopropyl | H | 179 | 1,6 | | 10—1000 | 400* | 1/500 | $10^{-6}$ | $10^{-9}$ | |
| LXII | Methoxyäthyl | H | 205 | 1,2 | | 0,2—1000 | > 2000 | 1/1000 | $10^{-7}$ | | |
| LXIII | 1-Methyl-phenyl(3) | H | 122 | | | 100—1000 | | 1/250 | | | |
| | $N\langle^{R_1}_{R_2}$ | | | | | | | | | | |
| LXIV | Morpholino | | 610 | 2,0 | | 10000 bis 30000 | > 1000 | 1/500 | $10^{-5}$ | | |
| | *N-substituierte α-Amino-butyryl-brenzkatechine (C).* | | | | | | | | | | |
| | | | Substanz / Adrenalone | | | | | | | | |
| LXV | 1-Propyl | H | 152 | 0,7 | | 5000 | > 500 | 1/100* | $10^{-7}$ | | |
| | $N\langle^{R_1}_{R_2}$ | | | | | | | | | | |
| LXVI | Morpholino | | | | | 50000 | > 500 | 1/100* | | | |

Tabelle 5. *N-substituierte α-(3-Methoxy-4-oxyphenyl)-β-aminoäthanole (A).*



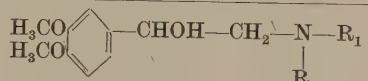
| Nr. | $R_1$ | $R_2$ | Toxicität: Maus LD. 50 i. v. mg/kg | Toxicität: Verhältnis Substanz / Nor-Adrenaline | Blutdruck Katze γ/Tier: Steigerung | Blutdruck Katze γ/Tier: Senkung | Glatte Muskulatur: Uterus Kanin Erregende Adrenalin-Konz. = 1 | Glatte Muskulatur: Asthmolyse Mol. Grenzkonzentration Inhal. | STRAUB-Herz Grenzkonzentration Inotropie: Pos. | STRAUB-Herz Grenzkonzentration Inotropie: Neg. | Literatur |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LXVII | i-Propyl | H | 305 | 2,5 | 2700—1100 | | > 500 | 1/100* | | $10^{-3}$ | |
| LXVIII | Oxyäthyl | H | 430 | 16,0 | 50* | | > 1000 | 1/100* | | $-10^{-4}$* | |
| | $N\langle^{R_1}_{R_2}$ | | | | | | | | | | |
| LXIX | Morpholino | | 751 | 0,6 | 1 | 5 | 1000 | 1/100* | | $10^{-4}$ | |

*N-substituierte Amino-aceto-guajacole (B).*



| | | | | Substanz / Adrenalone | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LXX | i-Propyl | H | > 250 | > 1,0 | 2000 | | 1000 | 1/100* | | $10^{-4}$ | |
| LXXI | Oxyäthyl | H | 740 | 1,9 | 1 | 2 | > 1000 | 1/100* | | $-10^{-4}$* | |
| | $N\langle^{R_1}_{R_2}$ | | | | | | | | | | |
| LXXII | Morpholino | | | | | 2—5 | 1000 | 1/100* | | $-10^{-4}$* | |

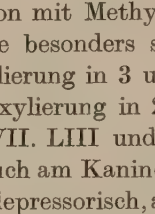
*N-substituierte α-(3,4-Dimethoxyphenyl)-β-aminoäthanole (C).*



| | | | | Substanz / Nor-Adrenaline | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LXXIII | i-Propyl | H | 150 | 1,25 | 100* | | > 1000 | 1/100* | $10^{-4}$ | $10^{-3}$ | |
| | $N\langle^{R_1}_{R_2}$ | | | | | | | | | | |
| LXXIV | Morpholino | | 759 | 0,6 | | 5—50 | > 1000 | 1/100* | | $10^{-6}$ | |

Tabelle 5. (Fortsetzung).

*N-substituierte Amino-aceto-veratrole (D).*



| | | | Substanz / Adrenalone | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LXXV | i-Propyl | H | 212 | 1,0 | 100* | | 1000* | 1/100* | $10^{-6}$ | $10^{-5}$ |
| | $N\langle^{R_1}_{R_2}$ | | | | | | | | | |
| LXXVI | Morpholino | | 630 | 0,73 | | 5—50 | > 1000 | 1/100 | $10^{-6}$ | |

* = unwirksam.

Toxicität der unsubstituierten Verbindung LIII bzw. die starke Entgiftung durch Substitution mit Methyl in 5 (LIV) und 6 (LV) und die besonders starke Entgiftung durch Methylierung in 3 und 6 (LVI) sowie durch Hydroxylierung in 2 plus Methylierung in 3 bei LVII. LIII und LIV wirken pressorisch und auch am Kaninchenuterus erregend. LV wirkt depressorisch, aber am Kaninchenuterus noch erregend, LVI und LVII lassen keine erregenden Wirkungen mehr erkennen. Die asthmolytische Wirkung von LIII ist geringer als die von X. Die Verbindungen LIV und LVI wirken schwächer, bei LV und LVII ist selbst die n/100 molare Lösung unwirksam. Am Straub-Herzen wirken alle Substanzen der Tab. 3 positiv inotrop.

*IV.* Die Tab. 4 enthält nur wenige Glieder der Reihe der N-substituierten α-(3, 4-Dioxy-phenyl-)-β-aminopropanole, (A), ferner der N-substituierten α-Amino-propionylbrenzkatechine (B), sowie der N-substituierten α-Aminobutyrylbrenzkatechine (C). Die Aminopropanole sind durchgehend weniger giftig als die zugehörigen Äthanole (vgl. Spalte 2 der Tab. 4a). LVIII und LIX wirken in sehr kleinen Dosen depressorisch und am Kaninchenuterus nicht erregend. Zur Aufhebung des Asthmas werden von LVIII und LIX höher konzentrierte Lösungen benötigt als von den entsprechenden Aminoäthanolen. LX ist im Vergleich zu XXII sehr viel weniger wirksam. Am Straub-Herzen zeigen die Verbindungen positiv inotrope und gelegentlich auch chronotrope Wirkungen. Die homologen Ketone (Tab. 4b) sind etwas weniger giftig als die entsprechenden Alkohole und zeigen auch keine erregende Wirkung an Uterus und Gefäßen, wohl aber wirken sie depressorisch. Die asthmolytische Wirkung ist bei LXI und LXII etwas schwächer, bei LXIII stärker als bei den Alkoholen. Am Straub-Herzen wirken die Ketone positiv inotrop. Unter den

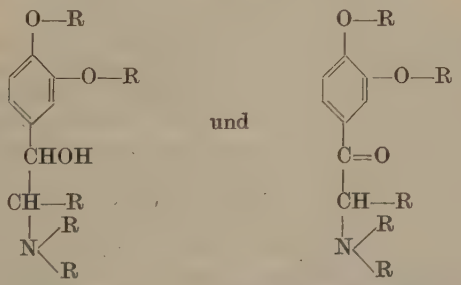
Aminobutyrylbrenzkatechinen (Tab. 4c) ist LXV weniger giftig als LXI, hingegen giftiger als LXVI. Erregende Wirkungen an Gefäßen und Kaninchenuterus fehlen. Die Aminobutyrylbrenzkatechine besitzen keine nennenswerte asthmolytische Wirkung.

*V.* Die Tab. 5 enthält wenige Vertreter der N-substituierten α-(3-Methoxy-4-oxyphenyl)-β-aminoäthanole (A), ferner der N-substituierten Amino-aceto-guajakole (B), sowie der N-substituierten α-(3,4-Dimethoxyphenyl-)-β-aminoäthanole (C) und der N-substituierten Amino-aceto-veratrole (D).

Die untersuchten N-(3-Methoxy-4-oxyphenyl-)-β-aminoäthanole (A) sind wenig giftig, z. B. LXVIII 16mal weniger giftig als das zugehörige Noradrenalin X, LXIX ist jedoch giftiger als XXII. Sie haben keine erregende Wirkung an Gefäßen und Kaninchenuterus. Die zugehörigen Ketone (B) verhalten sich sehr ähnlich. Von den (3,4-Dimethoxyphenyl-)-β-aminoäthanolen (C) ist LXXIII gleich giftig wie das entsprechende Noradrenalin V, LXXIV ist jedoch giftiger als XXII. An Gefäßen und Kaninchenuterus fehlen erregende Wirkungen. Die entsprechenden Ketone (D) verhalten sich in den Wirkungen ähnlich. Asthmolytische Wirkungen sind bei den in Tab. 5 aufgeführten Verbindungen nicht vorgekommen.

## Zusammenfasung.

Von 76 Substanzen der allgemeinen Formeln




wurden die Toxicität, Blutdruckwirkung, die Wirkung auf glatte Muskulatur (Uterus- und Bronchialmuskulatur) und Straub-Herz untersucht.

Die Toxicität ist bei den Verbindungen der Adrenalinreihe, die nur niedere Alkylreste am Stickstoff tragen, wesentlich stärker als bei den höheren. Die Anfangsglieder der Adrenalonreihe haben keine stärkere Giftwirkung als die übrigen.

Pressorische Wirkung haben in der Regel nur die Anfangsglieder der Adrenalin- und Adrenalonreihe sowie das cyclische Anhydrid 2-(3,4-Dioxyphenyl)-morpholin (LIII).

Erregend auf den Kaninchenuterus wirken nur die niedrigen Glieder der Adrenalinreihe und — wesentlich schwächer — auch LIII.

Positiv inotrope Reaktionen werden von fast allen untersuchten Stoffen ausgelöst.

Asthmolytische Eigenschaften haben fast alle Glieder der Adrenalinreihe, einige cyclische Anhydride von N-Oxyalkyl-nor-adrenalinen, N-substituierte (3,4-Dioxy-phenyl)-$\beta$-aminopropanole und N-substituierte Aminopropionyl-brenzcatechine. In der Adrenalinreihe nimmt die asthmolytische Wirkung von Nor-Adrenalin bis zum Äthyl-nor-adrenalin zu, bei Substitution mit längeren Ketten wieder ab. Verzweigung der Kette fördert sie, Ringschluß dagegen nicht.

Depressorisch wirken alle Verbindungen mit Ausnahme von Nor-Adrenalin, Nor-Adrenalon, LIII und wenigen weiteren Verbindungen, deren Wirkung auf den Blutdruck aber schwach ist.

Stoffe mit pressorischer Wirkung erregen zugleich auch die Uterusmuskulatur, wirken positiv inotrop und asthmolytisch. Diese weiteren Wirkungen sind aber kein typisches Merkmal dieser Gruppe, sie werden auch bei blutdrucksenkenden Stoffen gefunden.

Konstriktorische Eigenschaften werden durch eine Variation am Stickstoff eher verändert als dilatatorische.

Eine Förderung der adrenergischen Übertragung, charakterisiert durch die pressorische Wirkung, wird ausschließlich durch Verbindungen bewirkt, deren Stickstoff keinen oder einen niederen Alkylrest trägt. Als *Sympathicomimetica* kann man nur diese Stoffe bezeichnen.

## Literatur.

[1] Beglin, S., and A. M. Lands: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 14—18 (1949). — [2] Biel, H., E. G. Schwarz, E. P. Sprengler, H. A. Leiser and H. L. Friedmann: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 3149—53 (1954). — [3] Corrigan, J. R., and M. J. Langermann: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 530 (1949). — [4] Ellis, S.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 365 (1949). — [5] Engelhardt, E. L., F. S. Croosley and J. M. Sprague: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2718 (1950). — [6] Friebel, H., u. A. Basold: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 13 (1953). — [6a] Graubner, W.: Angew. Chem. **66**, 13/14 (1954). — [6b] Gruber, C. H. M., u. R. J. Matthews jr.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 1 (1953). — [7] Konzett, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 27 (1940). — [8] Lands, A. M., u. M. L. Tainter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 76 (1953). — [9] Lands, A. M., F. P. Luduena, J. I. Grant and E. Ananenko: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 45 (1950). — [9a] Lands, A. M., F. P. Luduena and B. F. Tullar: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 469 (1954). — [10] Marsh, D. F., M. H. Pelletier and C. A. Ross: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 108 (1948). — [11] Nickerson, M., and G. M. Nomaguchi: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 284 (1953). — [12] Seibert, R. A., and C. A. Handley: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 46, 304 (1954). — [13] Schulte, J. W., E. C. Reif, J. A. Bacher, W. S. Lawrence and M. L. Tainter: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **71**, 62 (1941). — [14] Thomae, O., u. H. Wick: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 540 (1954).

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium d. Schering AG., Berlin N 65, Müllerstr. 170/2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 505—517 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle).

# Wirkung von E 605 und anderen Esteraseblockern auf Körperstell- und -haltereflexe.

Von
K.-P. Schaefer.

Mit 1 Textabbildung.

*(Eingegangen am 28. Mai 1955.)*

Das hochwirksame Insecticid E 605 („Parathion", Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat) ist ein starkes Gift für den Organsimus des Warmblüters. Eine Vergiftung mit E 605, dessen Hemmwirkung auf die Cholinesterase vielfach für seine Wirkungsweise verantwortlich gemacht wird, verläuft vielgestaltig und in zeitlicher Hinsicht wechselvoll (Hagen u. Reinl; Taschen u. Wirriger: Jantzen; Hecht u. Wirth: Wilhelmi u. Domenjoz u. a.). Im allgemeinen beherrschen zunächst muscarinartige Reaktionen im Bereich des peripheren vegetativen Nervensystems das klinische Bild. Bei fortschreitender Vergiftung treten zentralnervöse Symptome in den Vordergrund. Im Tierversuch und auch bei Vergiftungen am Menschen sind Unsicherheit des Ganges, Koordinationsstörungen und mangelhafte Lagekorrektur als einleitende Erscheinungen beschrieben worden.

Es erschien daher sinnvoll, eine über die gewöhnliche Beschreibung des Vergiftungsbildes hinausgehende Prüfung der wichtigsten die Körperhaltung und Körperstellung regulierenden Reflexe durchzuführen. In vorhergehenden Arbeiten wurde E 605 bereits ein Angriffspunkt am Rückenmark und in bestimmten Gebieten des Groß- und Stammhirnes zugesprochen (Enders u. Ruf; Duensing u. Erdmann; Erdmann u. Schaefer). Mit einer Beeinträchtigung der Stellfunktionen, deren Zentren vorwiegend im Mittelhirn liegen, war also zu rechnen.

Eine Prüfung der Stellreflexe könnte vielleicht auch spezifische Wirkungen aufzeigen. So wurde schon von Magnus, Schoen, Girndt u. a. gezeigt, daß pharmakologisch besonders typische Stoffe wie Narkotica und Krampfgifte die Stellreflexe in bestimmter, charakteristischer Reihenfolge beeinflussen. Ein Vergleich mit den Wirkungen anderer Cholinesteraseblocker war aus diesem Grunde naheliegend. Da keine entsprechenden Angaben in der Literatur vorlagen, wurden Eserin, Prostigmin und DFP in die Untersuchung einbezogen. In ergänzenden Versuchen

prüften wir schließlich Wirkungen auf die „Hüpf- und Aufsetzreaktionen", die nach Bard vorwiegend im corticalen Bereich verankert sein sollen. Die unterschiedliche Beeinflussung von Rinden- und Hirnstammfunktionen durch cholinesterasehemmende Stoffe (Duensing u. Erdmann) könnte so erneut nachgewiesen werden.

## I. Methodik.

Die Prüfung der Stellreflexe wurde, von ergänzenden Versuchen an Katzen abgesehen, an Meerschweinchen durchgeführt, deren Stellfunktionen ausgeprägt hervortreten. Um stärkere Wirkungen auf Atmung und Kreislauf zu verhüten, wurde ein Teil der Versuche unter Atropinschutz durchgeführt. Die Tiere erhielten 1 mg/kg Atropin i.p., sobald stärkere Nebenwirkungen (Speichelfluß, Anzeichen für Darmkrämpfe, fibrilläre Zuckungen usw.) auftraten. Eine primäre, durch Kreislaufkollaps und Bronchospasmus bedingte zentrale Lähmung versuchten wir hierdurch hinauszuschieben. Außerdem stellte es sich als notwendig heraus, den oft sehr stürmischen Vergiftungsverlauf, der eine systematische Prüfung einzelner Reflexe kaum zuließ, durch protrahierte Giftzufuhr auf eine größere Zeitspanne auszudehnen. Bei diesem Vorgehen wurden keine eindeutigen Grenzdosen für den Eintritt bestimmter Lähmungsgrade ermittelt, es konnte aber bei dem protrahierten Vergiftungsverlauf die Reihenfolge des Ausfalles einzelner Reaktionen genauer bestimmt werden. Die Pharmaka wurden nach folgendem Injektionsschema an Meerschweinchen (M) und Katzen (K) intraperitoneal injiziert, wobei unter Berücksichtigung des klinischen Bildes der zeitliche Abstand zwischen den Injektionen, besonders im präletalen Stadium, um ein Geringes variiert wurde. Im allgemeinen führten 2—3 Nachinjektionen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Stellreflexe.

| | | |
|---|---|---|
| *1. E 605* | | |
| M: 5 mg/kg als Basisdosis, alle | 10 min | weitere 2 mg/kg |
| K: 3 mg/kg | 10 | 1 mg/kg |
| *2. Eserin* | | |
| M: 1 mg/kg | 10 | 0,5 mg/kg |
| K: 1 mg/kg | 10 | 1 mg/kg |
| *3. Prostigmin* | | |
| M: 0,2 mg/kg | 10 | 0,1 mg/kg |
| K: 0,3 mg/kg | 10 | 0,2 mg/kg |
| *4. DFP* | | |
| M: 1 mg/kg | 10 | 1 mg/kg |
| K: 1 mg/kg | 10 | 1 mg/kg |

E 605 injizierten wir als Lösung $10^{-2}$ in Propylenglykol, hergestellt aus einer alkoholischen Stammlösung $10^{-1}$. Eserin kam als Sulfat $5 \cdot 10^{-3}$ in wäßriger Lösung zur Anwendung. Prostigmin[1] stand als Lösung $5 \cdot 10^{-4}$ in Ampullen zur Verfügung, während DFP[2] als Lösung $10^{-2}$ in Alkohol verabreicht wurde.

Geprüft wurden das Allgemeinverhalten der Tiere, die Halte- und Stellreflexe (s. Magnus) und die Hüpf- und Aufsetzreaktionen (s. Bard, Fulton).

1. Am *intakten* Meerschweinchen untersuchten wir vorwiegend das Allgemeinverhalten beim Sitzen, Springen und Laufen, außerdem die Stellreflexe wie Labyrinthreflexe auf den Kopf, Progressivreaktionen, horizontale Drehreaktionen und Körperstellreflexe.

[1] Prostigmin = Dimethylcarbaminsäureester des m-Oxy-phenyltrimethylammoniummethylsulfats.

[2] DFP = Diisopropylfluorphosphat.

2. Nach funktioneller Ausschaltung eines Labyrinthes durch Einspritzen von 0,1 cm³ einer 5%igen Cocainlösung in das Mittelohr einer Seite prüften wir die am normalen Meerschweinchen nicht sehr ausgeprägten tonischen Reaktionen wie den tonischen Labyrinthreflex auf die Muskulatur des Halses. Das Verschwinden der asymmetrischen Körperstellung, die ja in erster Linie durch den einseitigen tonischen Labyrinthreflex auf die Halsmuskulatur zustande kommt, würde einer Lähmung des Labyrinthreflexes auf den Hals und der sekundär vom Hals ausgelösten tonischen Reaktion auf den Körper entsprechen. Beobachtet wurden die noch vorhandenen Stellreflexe, die Drehung um die Längsachse des Körpers (Grunddrehung), die Wendung des Kopfes, die vertikale Deviation der Augen und der Spontannystagmus, welcher ebenfalls durch einseitige Einwirkung des noch intakten Labyrinthes zustande kommt.

3. In einer weiteren Versuchsserie mit Meerschweinchen wurde zuerst *ein* Labyrinth durch Einspritzen von 0,1 cm³ Chloroform in das Mittelohr zerstört (abgeändertes Verfahren von Brown-Séquard, s. Magnus). Die nachträgliche Ausschaltung des zweiten Labyrinthes durch Cocain ließ dann Spontanreaktionen erkennen, die als rein zentralbedingt angesehen werden müssen (Bechtereff-Kompensation): Das Zentralnervensystem sucht nach der chronischen Ausschaltung des ersten Labyrinthes die asymmetrische Tonuslage zu beseitigen. Es entsteht hierdurch eine zentrale Überwertigkeit einer Seite, die dann einige Tage später nach Cocaineinspritzung in das zweite Labyrinth hervortritt. Die Symptome sind die gleichen wie bei einseitiger Ausschaltung und unterscheiden sich lediglich darin, daß sie zentralen Ursprungs sind. Wir prüften die Grunddrehung des Körpers, die Wendung des Kopfes, Deviation und Spontannystagmus der Augen und die noch vorhandenen Körperstellreflexe.

4. Um zusätzlich die weitgehend cortical bedingten Hüpf- und Aufsetzreaktionen (Bard, Fulton) zeigen zu können, prüften wir die genannten Stoffe auch an Katzen.

## II. Versuche an Meerschweinchen.

### *1. Die Wirkung von E 605.*

a) Am *intakten Meerschweinchen* (5 Versuche ohne Atropinschutz, 7 Versuche mit Atropinschutz) zeigen sich als erste Zeichen der Vergiftung nach einer Injektion von 5 mg/kg E 605 die bekannten muscarinartigen Symptome. Weitere 2 mg/kg E 605 — injiziert nach dem angegebenen Schema — führen in der Mehrzahl der Versuche zum Erlöschen der Labyrinthstellreflexe auf den Kopf. Der symmetrische Labyrinthstellreflex (Korrektur der Kopfstellung durch Drehung um die bitemporale Achse) und der asymmetrische Labyrinthstellreflex (Korrektur der Kopfstellung durch Drehung um die nasooccipitale Achse) fallen beinahe gleichzeitig aus. Die Meerschweinchen können sich aber orientieren und laufen aus dem Hellen in das Dunkle. Die Labyrinthstellreflexe auf den Kopf werden also zu einem Zeitpunkt gelähmt, zu dem Drehreaktionen und die Fähigkeit zum aufrechten Stehen noch vorhanden sind.

Als nächste Reflexgruppe werden die Progressivreaktionen beeinträchtigt. Die Lähmung des Zehenspreizreflexes (Spreizen bei Abwärtsbewegungen), eine bei Meerschweinchen recht zuverlässige Reaktion, zeigt sich nahezu gleichzeitig mit der Lähmung der Labyrinthstellreflexe

auf den Kopf. Anschließend verschwindet die weniger deutliche Liftreaktion, während die Bereitschaft zum Sprung des öfteren bis zur beginnenden Lähmung der Drehreaktionen erhalten bleibt.

Der Ausfall der genannten Reflexe macht sich bereits bei der Durchführung komplizierter Allgemeinreaktionen bemerkbar. Die Tiere werden ataktisch, sie schwanken beim Laufen und fallen beim Sprung auf den Kopf. Der Fallumdrehreflex wird mangelhaft ausgeführt. Oft gelingt es, den bei normalen Tieren überlagerten tonischen Halsreflex auf die Extremitäten (bei Rechtsdrehung des Kopfes Streckung der rechten Vorderpfote) auszulösen.

Eine Lähmung der horizontalen Drehreaktionen beherrscht das nun folgende Stadium. Die Reihenfolge, in welcher die Reflexe dieser Gruppe ausfallen, schwankt etwas. Folgende Reihe entspricht etwa dem durchschnittlichen Ergebnis aller Versuche: Kopfdrehnystagmus, Augendrehnystagmus, Augendrehnachnystagmus, Kopfdrehreaktion, Kopfdrehnachreaktion. Die kompensatorischen Augenstellungen (Rollen der Augen und vertikale Abweichung) werden allmählich schwächer, sind aber noch längere Zeit nachweisbar. Dyspnoische Atmung, Bradykardie und die blasse oder zyanotische Farbe von Schleimhaut und Extremitäten zeugen für den starken Grad der Allgemeinvergiftung. Charakteristisch ist in diesem Stadium aber noch der relativ gut erhaltene Tonus und die Fähigkeit, eine passiv erteilte Seitenlage zu korrigieren. Die Meerschweinchen können stehen, den Kopf hoch halten und reagieren auf Schmerzreize.

Dann verschwinden die Stellreflexe vom Kopf auf den Körper — der Reflex vom Kopf auf den Hinterkörper kann schon eher negativ werden — und vom Körper auf den Körper. Der Stellreflex vom Körper auf den Kopf bleibt am längsten erhalten und tritt noch in Erscheinung, wenn der Hinterkörper nicht mehr aufgerichtet werden kann. Um dieses Lähmungsstadium zu erreichen, sind oft weitere 2 mg/kg E 605 erforderlich, also insgesamt 9 oder 11 mg/kg. Dem klinischen Bild entsprechend muß vorsichtig dosiert und eventuell der Zeitabstand zwischen den Injektionen vergrößert werden, um die tötliche Atemlähmung hinauszuschieben.

Es erlöschen nun die tonischen Augenreaktionen vollständig und der Cornealreflex ist nicht mehr auszulösen. Starke Schmerzreize werden noch schwach beantwortet. Spontane Laufbewegungen der Vorderpfoten sind für einige Minuten noch die einzige Äußerung des in vollkommener Seitenlage befindlichen Meerschweinchens. Dann erfolgt — in Abhängigkeit von der Dosierung des Giftes — in Minuten oder Stunden der Tod durch Atemlähmung.

Eine Injektion von 1 mg/kg Atropin während des Vergiftungsablaufes beseitigt weitgehend die muscarinartigen Erscheinungen. Dissoziierte Atembewegungen von Thorax und Abdomen (Zwerchfellähmung?) werden

normalisiert oder verhindert. Die Schleimhäute sind hochrot, und das Herz schlägt voll und kräftig. Eine Bradykardie besteht nicht. Auch unter derartigen Bedingungen gelingt es, eine vollkommene Lähmung aller Reflexe herbeizuführen und die Tiere in diesem Zustand längere Zeit überleben zu lassen (bis zu mehreren Stunden). Eine merkliche Dosisverschiebung tritt nicht ein, und die Reihenfolge des Reflexausfalles bleibt die gleiche. Selbst höhere Atropindosen (5 mg/kg) besitzen an bereits gelähmten Tieren keine antagonistische Wirkung.

b) Bei *einseitiger Ausschaltung des Labyrinthes* (4 Versuche ohne, 5 Versuche mit Atropinschutz) entspricht eine Lähmung des noch vorhandenen asymmetrischen Labyrinthstellreflexes auf den Kopf zeitlich der

Tabelle 1. *Reihenfolge der Lähmung einzelner Stellreflexe unter fortschreitender Vergiftung mit E 605 am intakten Tier, bei einseitiger Ausschaltung des Labyrinthes und bei doppeseitiger, zweizeitiger Ausschaltung (Meerschweinchen).*

| Am intakten Tier | Bei einseitiger Ausschaltung des Labyrinthes | Bei doppelseitiger, zweizeitiger Ausschaltung (BECHTEREFF-Kompensation) |
|---|---|---|
| Labyrinthstellreflexe → Kopf | Labyrinthstellreflex → Kopf (asymm.) | |
| Progressivreaktionen | Progressivreaktionen (?) | |
| Horizontale Drehreaktionen | Spontannystagmus und Drehreaktionen, soweit erhalten | Spontannystagmus |
| | Wendung des Kopfes | Wendung des Kopfes |
| Körperstellreflexe | Körperstellreflexe | Körperstellreflexe (?) |
| Kompensatorische Augenstellungen | Vertikale Augendeviation | Vertikale Augendeviation |
| | Grunddrehung (tonischer Labyrinthreflex auf Halsmuskulatur) | Grunddrehung (tonischer Labyrinthreflex auf Halsmuskulatur) |
| Cornealreflex Schmerzreize (Kneifen) | Cornealreflex Schmerzreize (Kneifen) | Cornealreflex Schmerzreize (Kneifen) |

Wirkung von E 605 am intakten Tier. Bei etwa 7 mg/kg wird die bei einseitiger Ausschaltung typische Kopfstellung, wobei das ausgefallene Labyrinth nach unten zeigt, nicht mehr eingenommen. Der in einigen Versuchen deutliche Zehenreflex verschwindet anschließend. Dann kommt der Spontannystagmus, der durch entsprechende Drehreaktionen verstärkt oder abgeschwächt werden kann, zum Erliegen. Durch Wendung des Kopfes und Drehung des Halses und Körpers bedingte asymmetrische Stellung wird zu einem Zeitpunkt aufgehoben, an dem die Tiere noch aufrecht stehen können (Abb. 1). Da bei Hängelage eine Drehung noch deutlich vorhanden ist, überwiegen also zeitweilig die Körperstellreflexe,

die korrigierend eingreifen. Die Tiere befinden sich schließlich in Seitenlage, und die spontane Deviation der Augen ist nicht mehr sichtbar. Der tonische Labyrinthreflex auf die Muskulatur des Halses, der als der wesentliche Bestandteil der Grunddrehung anzusehen ist, wird ebenfalls negativ.

Unter Atropinschutz bleibt die Reihenfolge des Reflexausfalles die gleiche.

Abb. 1. Meerschweinchen, einseitige Ausschaltung des rechten a) Asymmetrische Haltung vor Vergiftung mit E 605.

c) Bei *doppelseitiger, zweizeitiger Ausschaltung der Labyrinthe* (4 Versuche mit Atropinschutz) erfolgt bei etwa 9 mg/kg E 605 eine Lähmung der rein zentral bedingten Spontanreaktionen, die nach Ausschaltung des zweiten Labyrinthes hervortreten (Bechtereff-Kompensation). Hierbei entspricht die Reihenfolge des Reflexausfalles den Versuchen mit einseitig ausgeschaltetem Labyrinth. Eine Lähmung der Körperstellreflexe kann nicht mit Sicherheit eingeordnet werden, da die Tiere sehr unsicher sind und die Reaktionen sich im einzelnen verwischen.

In Tab. 1 (S. 509) sind die Befunde vergleichend zusammengestellt.

### *2. Die Wirkung von Eserin, Prostigmin und DFP.*

Von Unterschieden im allgemeinen Vergiftungsbild abgesehen, besitzen die Pharmaka Eserin, Prostigmin und DFP eine einheitliche Wirkungsweise auf die geprüften Reflexe. Sie lähmen die Stellfunktionen in der gleichen Reihenfolge wie E 605 sowohl am intakten Tier wie am Tier

mit ausgeschalteten Labyrinthen. Atropin schützt Atmung und Kreislauf und besitzt keinen wesentlichen Einfluß auf den Ausfall der untersuchten Reaktionen. Es bestehen einige Besonderheiten:

*a) Eserin* (14 Versuche) — Bei der protrahierten Injektion gelingt es, unter Vermeidung von Krämpfen eine Lähmung der Stellreflexe zu erzielen. Hierzu sind insgesamt 2—3 mg/kg erforderlich. Sobald die Labyrinthstellreflexe auf den Kopf gelähmt sind, kann vielfach der tonische Labyrinthreflex auf die Extremitäten ausgelöst werden. Diese tonische Reaktion kann lange erhalten bleiben. Aus einer nicht korrigierten Seitenlage richten sich die Tiere des öfteren spontan auf.

Labyrinthes durch Cocaininjektion in das Mittelohr rechts.
b) Nach 9 mg/kg E 605. — Beseitigung der asymmetrischen Körperstellung

*b) Prostigmin* (12 Versuche) — 0,4 mg/kg führen zu einer beginnenden Lähmung der Stellreflexe. Nach weiteren 0,3—0,4 mg/kg kommt es schon zum Sistieren der Atmung. Prostigmin vermag unter noch guten Kreislaufverhältnissen die Körperreflexe kaum zu beeinträchtigen. Tonische Reaktionen werden ebenfalls nur wenig beeinflußt. 5 mg/kg Atropin wirken in geringem Maß antagonistisch. Die beeinträchtigten Körperstellreflexe können wieder deutlich werden.

*c) DFP* (10 Versuche) — 2 mg/kg beeinflussen bereits die Stellreflexe, weitere 2—3 mg/kg führen bei einer Applikation nach dem angegebenen Schema zum Tode durch Atemlähmung. Tonische Reaktionen werden relativ frühzeitig abgeschwächt.

### III. Versuche an Katzen.

Die Ergebnisse an Katzen sind wegen starker Nebenwirkungen ausschließlich unter Atropinschutz ermittelt worden. 1 mg/kg Atropin beseitigt weitgehend die muscarinartigen Symptome. Eine Beeinflussung

der Stellreflexe sowie der Hüpf- und Aufsetzreaktionen ist aber noch deutlich zu erkennen.

Die geprüften Pharmaka E 605, Eserin, Prostigmin und DFP lähmen die Stellreflexe in der gleichen Reihenfolge, wie bei Meerschweinchen. (Optische Einflüsse wurden in einigen Versuchen durch Kopfkappe ausgeschaltet.) Auffällig ist, daß Katzen beim Laufen und Springen frühzeitig ataktisch werden. Die ausgestreckten Vorderpfoten werden gespreizt und der Kopf befindet sich am Boden. Wenn Laufen möglich ist, wie besonders beim Prostigmin, so geschieht dieses in geduckter Haltung. Oft werden auch die Hinterpfoten nachgezogen. In vielen Fällen gelingt es, bei fortschreitender Lähmung tonische Reaktionen auf die Extremitäten auszulösen, die von der Stellung der Labyrinthe im Raume und der Haltung des Kopfes zum Körper abhängen. Derartige Reaktionen sind an normalen Tieren nicht deutlich zu beobachten.

Bemerkenswert ist, daß die recht komplizierten Hüpf- und Aufsetzreaktionen sehr spät zum Erliegen kommen. Während die Hüpfreaktionen mit den Körperstellreflexen verschwinden, reagieren Katzen mit negativen Körperstellreflexen oft noch mit den Aufsetzreaktionen (z. B. bei Berührung der Vorderpfoten mit dem Rand eines Tisches).

Folgende Einzelheiten sind zu erwähnen:

*1. E 605* (5 Versuche). Die Tiere sind anfangs erregt. Unsicherheit im Gang und beginnende Wirkung auf die Stellreflexe machen sich bei 3 mg/kg bemerkbar. Oft besteht eine Dissoziation der Bewegungen von Vorder- und Hinterpfoten, wobei zunächst die Tätigkeit der Hinterpfoten unkontrolliert bleibt. Nach Ausfall der Labyrinthstellreflexe auf den Kopf war in 3 Versuchen eine deutliche Streckstarre vorhanden, besonders in Rückenlage. Bei negativen Körperstellreflexen ist die Aufsetzreaktion der Vorderpfoten noch auslösbar. In 3 Versuchen gelang es, bei guter Atmung, hoch-roten Schleimhäuten und kräftig und schnell schlagendem Herzen den Zustand einer totalen schlaffen Lähmung herbeizuführen. 5 mg/kg Atropin führten zu einer weiteren Besserung der Kreislaufverhältnisse, zeigten aber keine antagonistische Wirkung auf die Stellreflexe. Die Tiere überlebten mehrere Stunden.

*2. Eserin* (3 Versuche). Zuerst besteht Unruhe und Übererregbarkeit der Reflexe. Bei 1 mg/kg treten ataktische Erscheinungen auf. Eine Streckstarre ist oft besonders ausgeprägt. Nach Ausfall der Drehreaktionen reagieren die Tiere noch visuell auf Fingerbewegungen und versuchen, in das Dunkle zu gelangen. Bei negativen Körperstellreflexen sind Hüpf- und Aufsetzreaktionen vorhanden.

*3. Prostigmin* (3 Versuche). Bereits vor einer Lähmung der Labyrinthstellreflexe sind die Katzen beim Sprung unsicher und fallen auf die Schnauze. Bei 0,5 mg/kg werden die Stellreflexe deutlich abgeschwächt. Der Fallumdrehreflex ist ebenfalls bald gestört. Bei gelähmten Drehreaktionen können die Tiere einige Schritte weit kriechen und streben in das Dunkle. Sie folgen visuell den Fingerbewegungen und reagieren auf andere Katzen. Bei eingeschränkten Körperstellreflexen sind die Aufsetzreflexe immer noch deutlich. Die Schleimhäute sind in diesem Stadium blaß und cyanotisch. 5 mg/kg Atropin bewirken eine Korrektur der passiv erteilten Seitenlage.

*4. DFP* (3 Versuche). Bei 2 mg/kg ist eine deutliche Wirkung zu erkennen. Eine Lähmung der Körperstellreflexe erfolgt bei 4 mg/kg; diese Dosis führt nach längerer

Zeit ebenfalls zum Tode durch Atemlähmung. Die Tiere sind ängstlich und zeigen keine Erregung. Alle Reaktionen werden träge ausgeführt. Charakteristisch ist eine allgemeine Herabsetzung des Tonus, wobei die Reihenfolge des Ausfalles der Stellreflexe erhalten bleibt; lediglich die Körperstellreflexe werden frühzeitig abgeschwächt. In einem Versuch gelang es, bei relativ guter Atmung und äußerlich normalen Kreislaufverhältnissen eine totale Lähmung zu erzielen. 5 mg/kg Atropin wirkten nicht antagonistisch.

## IV. Diskussion.

Die untersuchten Cholinesteraseblocker besitzen starke Allgemeinwirkungen auf Atmung und Kreislauf. Bei einer Prüfung derartiger Stoffe am intakten Organismus muß deshalb berücksichtigt werden, daß *spezifische* Wirkungen durch veränderte Kreislaufbedingungen und die Folgen einer Hypoxämie überlagert werden können.

Bei der Vergiftung mit E 605 war zunächst interessant, daß die geprüften Reflexe der Körperhaltung und -stellung in einem Stadium ausfielen, das keinen Anhalt für eine Lähmung der Atmung und des Kreislaufes bot. Auch die Motorik blieb noch für längere Zeit erhalten. Die Stellreflexe werden also früher gelähmt als die Atmung, und es sind zwei Drittel derjenigen Dosis erforderlich, die zu einem Stillstand der Atemtätigkeit führt. Dieser Befund ist auch charakteristisch für die Wirkungsweise von Eserin, Prostigmin und DFP. Da vorangehende Arbeiten (Enders u. Ruf; Duensing u. Erdmann; Erdmann u. Schaefer; Erdmann, Kempe u. Lühning) für eine Lähmung in Rückenmark und Stammhirn sprechen, verdient die frühzeitige Beeinflussung der Stellfunktionen eine gewisse Beachtung.

Bemerkenswert ist ferner die gleichmäßige Reihenfolge, in welcher die geprüften Funktionen ausgeschaltet wurden. Die genannten Pharmaka besitzen — von einigen Abweichungen bei Vergiftung mit DFP abgesehen — auch untereinander eine einheitliche Wirkungsweise an Meerschweinchen und Katzen (vgl. S. 510ff). Das einheitliche Ergebnis überrascht, da die untersuchten Stoffe sonst in chemischer und biologischer Hinsicht so unterschiedliche Eigenschaften besitzen, daß des öfteren — besonders im Hinblick auf eine Hemmung der Cholinesterase — an einem gemeinsamen Wirkungsmechanismus gezweifelt worden ist (Literatur bei Taverner; Hecht u. Wirth; Diamant; Erdmann u. Schaffer). Die Reihenfolge des Ausfalls einzelner Stellreflexe hat sich in zahlreichen Arbeiten mit Narkoticis, Krampfgiften u. a. aber als so spezifisch erwiesen, daß die vorliegenden Befunde doch einen gemeinsamen pharmakologischen Angriffspunkt vermuten lassen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Stellreflexe in einer Reihenfolge gelähmt werden, die nicht den bekannten Narkosestadien entspricht. Die in unseren Versuchen sehr resistenten Körperstellreflexe versagen unter dem Einfluß der Narkotica durchweg frühzeitig. Das „Interneuronengift" Myanesin

besitzt in seiner Wirkungsweise auf die Stellreflexe dagegen eine große Ähnlichkeit mit den cholinesterasehemmenden Stoffen (eigene unveröffentlichte Befunde).

Die Lähmung der Stellreflexe kann durch eine Beeinträchtigung peripherer oder zentraler Vorgänge zustande kommen. Unsere Ergebnisse enthalten zunächst keinen Beweis für eine ausschließlich periphere Wirkung. Eine Beeinflussung propriozeptiver Elemente der Muskulatur oder sensibler Endorgane der Haut, die bei der Auslösung der Körperstellreflexe eine besondere Rolle spielen, können wir nicht nachweisen. Eine lokale Applikation von Cholinesterasehemmern in das Mittelohr soll ebenfalls keine Wirkung hervorrufen (Scala u. Spiegel). Gegen eine periphere Wirkung, in erster Linie im Bereich des N. octavus, spricht weiter der zeitlich divergierende Ausfall von Funktionen, die gleiche Rezeptororgane besitzen: Nach Magnus führt eine Ausschaltung des Sacculus zur Aufhebung des asymmetrischen Labyrinthstellreflexes auf den Kopf und der vertikalen Augendeviation, eine Ausschaltung des Utriculus zum Ausfall des symmetrischen Labyrinthstellreflexes auf den Kopf und bei einseitiger Lähmung zur Grunddrehung. Die Progressivreaktionen und Drehreaktionen werden den Bogengängen zugeordnet. Unsere Ergebnisse zeigen, daß sowohl die Lagereflexe des Otolithenapparates wie die Bewegungsreaktionen der Bogengänge zeitlich nacheinander ausfallen. — Eine periphere Wirkung ist auf Grund dieser Tatsachen allerdings nicht sicher auszuschließen, da verschiedene zu einem Organ gehörige Funktionen unterschiedliche Schwellenwerte für ihre Auslöschung besitzen können. Außerdem führen neuere Arbeiten (zusammenfassende Datstellung bei v. Buddenbrock) zu der Ansicht, daß eine Zuordnung der geprüften Reflexe zu bestimmten Receptoren innerhalb des Labyrinthes nicht so eindeutig vorgenommen werden kann. Eine gegenseitige Unterstützung einzelner Funktionen des Labyrinthes wurde bereits von Magnus theoretisch gefordert.

Als Ursache für die in unseren Versuchen charakteristische Reihenfolge der Stellreflexlähmungen könnte die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zentren im Bereich des Zentralnervensystems und die wechselnde Anzahl von Synapsen (Erdmann u. Schaefer), aus denen die jeweiligen Reflexbögen zusammengesetzt sind, in Betracht gezogen werden. Bereits zitierte Arbeiten sprechen für eine ausgedehnte zentralnervöse Wirkung der untersuchten Stoffe. Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang, daß Cholinesterasehemmer bei geeigneter intraarterieller Injektion ein zentralbedingtes „vestibuläres Syndrom" hervorrufen, das durch überwiegend einseitige Erregung der Kerngebiete zustande kommen soll (Diamant). Der Beweis einer zentralen *Lähmung* der Halte- und Stellreflexe ist damit aber noch nicht erbracht.

Die von Bechtereff beschriebene zentrale Kompensation (s. Magnus; v. Buddenbrock) erwies sich jedoch als geeignete Methode, um eine direkte Wirkung auf die Zentren der Stellreflexe nachzuweisen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die rein zentral bedingten Erscheinungen wie Grunddrehung, Wendung des Kopfes und Spontannystagmus, die nach zweizeitiger Entfernung der Labyrinthe auftreten, durch E 605 und die verwandten Stoffe ebenfalls gelähmt werden. Die Reihenfolge des Ausfalles entspricht etwa den Versuchen an Meerschweinchen mit einseitig

ausgeschaltetem Labyrinth. Eine Lähmung im Bereich der entsprechenden Kerne des Stammhirnes dürfte hiermit erwiesen sein. Die in vielen Versuchen beobachteten tonischen Labyrinthreflexe, die am normalen Tier nicht hervortreten, weisen ebenfalls auf zentrale Veränderungen hin. — Betrachten wir die Lähmung der Stellfunktionen als eine Störung zentraler Vorgänge, so erscheint auch der geringgradige Antagonismus von Atropin verständlicher. Bei einer Vergiftung mit E 605 konnte die Lähmung polysynaptischer Reflexe (Erdmann u. Schaefer) und die lähmende Wirkung auf die Atmung (Erdmann, Kempe u. Lühning) ebenfalls nicht aufgehoben werden. Es ist auffällig, daß bisher nur zentral erregende Wirkungen, die bei geringen und meist intraarteriell injizierten Dosen auftreten, durch Atropin antagonistisch beeinflußt werden konnten.

Offen bleibt noch die Frage, ob der einheitliche Ausfall der geprüften Reflexe durch Sauerstoffmangel und allgemeine Senkung des Blutdruckes zustande kommt.

In neueren Arbeiten (Lundholm; Holmstedt; Wright; Krop u. Kunkel u. a.) findet bei einer Vergiftung mit Cholinesterasehemmern der Sauerstoffmangel infolge Bronchokonstriktion und Zwerchfelllähmung eine starke Beachtung. Eine Hypoxämie als gemeinsames Wirkungsprinzip wäre wohl denkbar, zumal eine Herabsetzung des Schlagvolumens erschwerend hinzutreten soll. Unsere Versuche unter Atropinschutz bieten aber keinen Anhalt für eine Lähmung der Atmung und des Kreislaufes. Eine fraktionierte Injektion kleiner Giftmengen verhindert den akuten Blutdrucksturz und läßt eher eine gegenteilige Reaktion vermuten. Derartige Kreislaufwirkungen bei geringer Dosierung sind bekannt und neuerdings gedeutet worden (Salerno u. Coon; v. Eickstedt, Erdmann u. Schaefer).

Auf Grund des Vergiftungsbildes ist eine durch Hypoxämie und allgemeine Senkung des Blutdruckes bedingte Lähmung unwahrscheinlich. Mit E 605 und Eserin vergiftete Tiere können das Stadium einer totalen Lähmung erreichen, ohne sichtbare Symptome für ein Versagen der Atmung und des Kreislaufes zu zeigen. Lediglich bei Prostigmin und DFP war es zweifelhaft, ob das letzte Stadium der Vergiftung, einschließlich einer Lähmung der Körperstellreflexe, nicht durch Sauerstoffmangel und die Folgen einer allgemeinen Blutdrucksenkung überlagert gewesen sein könnte.

Gegen Hypoxämie als Ursache der Lähmung spricht ferner, daß sich eine asphyktische Lähmung der Stellreflexe wesentlich von dem hier erhobenen Befund unterscheidet (Kleitmann u. Magnus, eigene unveröffentlichte Befunde). So werden die unter asphyktischen Bedingungen frühzeitig gelähmten Körperstellreflexe erst nach Ausfall der Drehreaktion ausgeschaltet, die gegen Sauerstoffmangel wiederum sehr resistent sind. Auch das histologische Bild nach einer Vergiftung mit E 605 oder Eserin spricht nicht für eine Verminderung der zerebralen Durchblutung (Kempe). Der späte Ausfall der Hüpf- und Aufsetzreaktionen, die vorwiegend im corticalen Bereich umgeschaltet werden sollen, weist ebenfalls auf eine geringe Bedeutung des allgemeinen Sauerstoffmangels hin. Wenn bestimmte Reflexe durch Anoxie oder Ischämie zum Erliegen kommen, so in erster Linie diejenigen des Großhirns (Opitz

u. Schneider), deren Funktionstüchtigkeit bei Sauerstoffmangel am stärksten beeinträchtigt sein dürfte.

Wie weit die Hüpf- und Aufsetzreaktionen bei der Katze tatsächlich von der Funktion der Großhirnrinde abhängen, möchten wir nicht entscheiden. Ihr Wert besteht zunächst darin, daß sie am intakten Tier die Möglichkeit bieten, genau definierte, komplizierte Bewegungsformen zu erfassen, die in einer „höheren" Ebene des Zentralnervensystems integriert werden. Bemerkenswert ist der späte Ausfall dieser Reflexe noch aus einem anderen Grunde. Vorangehende Arbeiten (s. Duensing u. Erdmann) weisen darauf hin, daß vorwiegend die phylogenetisch älteren Funktionen des Zentralnervensystems eine cholinerge Erregungsübertragung zu besitzen scheinen. Histochemischer Nachweis der Cholinesterase und Aktivitätsbestimmungen zeigen die stärksten Reaktionen jedenfalls in Bezirken, die vorwiegend den Zentren der Stellreflexe entsprechen. Mit einigem Vorbehalt kann also die Empfindlichkeit der Stellreflexe und die relative Resistenz der Hüpf- und Aufsetzreaktionen mit den genannten Befunden in Einklang gebracht werden.

## Zusammenfassung.

An Meerschweinchen und Katzen wurde die Wirkung von E 605 und anderen Cholinesterasehemmern auf die Reflexe der Körperhaltung und Körperstellung geprüft.

Bei der Vergiftung mit E 605 fallen Labyrinthstellreflexe auf den Kopf, Progressivreaktionen, horizontale Drehreaktionen und Körperstellreflexe in regelmäßiger Reihenfolge aus, bevor Atmung und Kreislauf zum Erliegen kommen. Da Eserin, Prostigmin und DFP die Stellreflexe in der gleichen Reihenfolge lähmen wie E 605, kann eine spezifische, den genannten Stoffen gemeinsame Wirkungsweise angenommen werden. Die Reihenfolge des Reflexausfalles stimmt weitgehend mit der Wirkung des Interneuronengiftes Myanesin überein und entspricht nicht der Lähmung durch Narkotica. Atropin besitzt auch in höheren Dosen keine nennenswerte antagonistische Wirkung.

Durch Ausschaltung eines Labyrinthes konnte gezeigt werden, daß tonische Reaktionen nach E 605, Eserin und Prostigmin sehr spät ausfallen. Der Nachweis eines zentralen Angriffspunktes gelang durch zweizeitige Ausschaltung beider Labyrinthe (Bechtereff-Kompensation).

An Katzen wurden die weitgehend cortical bedingten Hüpf- und Aufsetzreaktionen geprüft, welche ebenfalls lange erhalten bleiben.

## Literatur.

Bard, P.: Arch. Neurol. Psychiatr. **30**, 40 (1933). — v. Buddenbrock, W: Vergleichende Physiologie, Bd. I, Basel: Birkhäuser, 1952. — Diamant, H.: Acta Oto-laryngologica, suppl. **111** (1954). — Duensing, F., u. W.-D. Erdmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 506 (1954). — v. Eickstedt, K.-W., W.-D. Erdmann u. K.-P. Schaefer: unveröffentlicht. — Enders, A., u. H. Ruf: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 174 (1952). — Erdmann, W.-D., H. D. Kempe u. W. Lühning: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 359 (1955). — Erdmann, W.-D., u. K.-P. Schaefer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 519 (1954). — Fulton, J. F.: Physiologie des Nervensystems, Stuttgart: Enke 1952. — Girndt, O.:

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 90 (1932). — Hagen, J., u. W. Reinl: Münch. med. Wschr. **1950**, 450. — Hecht, G., u. W. Wirth: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 264 (1950). — Holmstedt, B.: Acta physiol. Scand. **25** Suppl. 90 (1951). — Jantzen, G.: Dtsch. Med. Wschr. **1951**, 1601. — Kempe, H. D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 533 (1954). — Kleitmann, N., u. R. Magnus: Pflüger's Arch. **205**, 142 (1925). — Krop, S., u. A. M. Kunkel: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **86**, 530 (1954). — Lundholm, L.: Acta physiol. Scand. (Stockh.) **161**, 345 (1949). — Magnus, R.: Körperstellung, Berlin: Springer, 1924. — Magnus, R., u. A. de Kleijn: Handb. d. norm. u. path. Physiol. **11**, 1926. — Opitz, E., u. M. Schneider: Erg. Physiol. **46**, 126 (1950). — Schoen, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 62 (1936). — Scala, N. P., u. E. A. Spiegel: Confinia neurol. **10**, 285 (1950), zit. nach Diamant. – Taschen, B., u. W. Wirriger: Dtsch. Med. Wschr. **1950**, 1478. — Taverner, D.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 84 (1954). — Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 321 (1951). — Wright, P. G.: J. of Physiol. **126**, 52 (1954).

Dr. Kurt-Peter Schaefer, Göttingen, Pharmakol. Institut d. Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 226, S. 518—526 (1955).

Aus den Forschungslaboratorien der E. Merck-Aktiengesellschaft, Darmstadt, Pharmakologische Abteilung.

# Über den Antagonismus von N-Allylnormorphin zu Morphin und Eukodal am Kreislauf von wachen Hunden*.

Von
E. Roesch.

Mit 7 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 7. Juni 1955.)*

Bei Kreislaufuntersuchungen an wachen Hunden fiel uns die schon von anderen Autoren (van Egmond, Schmidt und Livingston) erwähnte blutdrucksenkende und peripher gefäßerweiternde Wirkung von intravenös injiziertem Morphin auf. Entsprechende Kreislaufreaktionen sind auch beim Menschen beschrieben worden (Altschule und Pfeiffer), und Altschule sowie Beckman haben deswegen vor rascher intravenöser Injektion von Morphin bei Patienten gewarnt. Es erhob sich die Frage, ob N-Allylnormorphin, das ja die Atmungslähmung des Morphins vermindern oder aufheben kann, auch die Kreislaufwirkung antagonistisch beeinflußt. In die Untersuchungen wurde das Dihydrooxycodeinon (Eukodal) einbezogen, das bei Menschen (Mayer) und Hunden (Schnürch) weniger Nebenwirkungen aufweist als Morphin.

## Methodik.

An wachen Hunden wurden photokymographisch der arterielle Blutdruck an der Carotisschlinge (Schroeder, 1949) und die Atmung mittels einer Thoraxmanschette registriert. Den Capillardruck registrierten wir an der einen Vorderpfote bei einem Entlastungsdruck von 47,6 cm $H_2O$ (entsprechend 35 mm Hg) nach dem von Schroeder (1950) angegebenen Verfahren (aber mit gedämpftem Manometer). An der anderen Vorderpfote wurde ein zweiter Plethysmograph — wie der zur Capillardruckregistrierung verwandte — angelegt, der Hahn zwischen dem Plethysmographen und dem zur Einstellung des Entlastungsdruckes angeschlossenen Wassermanometer jedoch offen gelassen; auf diese Weise konnten die durch die Verschiebung des Wasservolumens bedingten Druckschwankungen als Pfotenvolumen registriert werden. Die Registrierung erfolgte also nicht streng isotonisch; die erhaltenen Werte sind jedoch dadurch nicht nennenswert beeinflußt, da die Druckänderungen in Anbetracht der Weite des Manometerrohres unerheblich waren. Die auftretenden Änderungen der Volumenpulsamplitude können nach Burton als ein brauchbarer Maßstab für das durchfließende Blutvolumen gelten. Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurden die Hohlmäntel der doppelwandigen Fußplethysmographen von einem Höppler-Thermostaten aus mit Wasser von 25° C durchströmt. — In einigen Fällen wurden die Kreislaufgrößen

* Herrn Prof. Dr. P. Wels zum 65. Geburtstag gewidmet.

nach Wezler u. Böger an Hand der Registrierung des Druckpulses an der Carotisschlinge und des Volumenpulses an der Arteria femoralis bestimmt. Dabei stellt jeder Punkt der Kurven einen Mittelwert aus allen Pulsen einer Atemperiode dar. — Die Injektionen wurden sämtlich intravenös durch eine in die Vena saphena parva eingestochene und mit Leukoplast fixierte Kanüle vorgenommen. Verwandt wurden: N-Allylnormorphin · HCl, Dihydrooxycodeinon · HCl (Eukodal, W. Z.), Morphin · HCl, Atropinsulfat und Ilvin [W. Z., das Maleat des 1-(p-Bromphenyl)-1-(2-pyridyl)-3-N,N-dimethylpropylamins] als Antihistaminicum, alle in wäßriger Lösung. — Die folgende Darstellung beruht auf insgesamt 75 Versuchen an 8 Carotisschlingenhunden.

### Versuchsergebnisse.

*a) N-Allylnormorphin.* N-Allylnormorphin wurde in Dosen von 0,1—16 mg/kg i.v. verabreicht. Nach Dosen über 0,5 mg/kg erfolgte ein geringer Blutdruckabfall, nach Dosen über 2 mg/kg meistens eine Pulsfrequenzerhöhung. Diese Wirkungen waren selbst bei den höchsten Dosen nicht wesentlich stärker als bei den niedrigen; die Dosiswirkungskurve verläuft also sehr flach. Bei 3 Hunden wurde eine Auswertung der Kreislaufgrößen (Wezler u. Böger) nach i.v. Injektionen von 1 mg/kg N-Allylnormorphin vorgenommen. Wie das Ergebnis bei einem dieser Hunde zeigt (Abb. 1), setzte N-Allylnormorphin den peripheren Widerstand und den Blutdruck herab; die Pulsfrequenz blieb unverändert. Es resultierte eine mäßige Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens. Auf die Extremitätendurchblutung war N-Allylnormorphin in Dosen bis zu 2 mg/kg i.v. ohne Einfluß. Höhere Dosen stimulierten die Atmung in bezug auf Frequenz und Tiefe und führten zu einem mäßigen Capillardruckabfall in der Pfote.

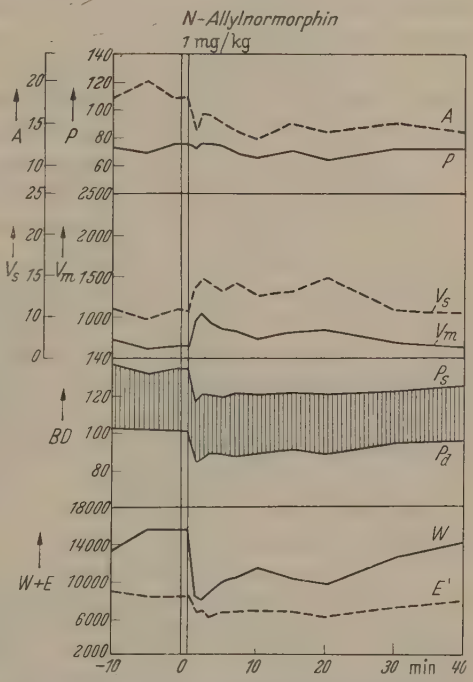



Abb. 1. Wirkung von i.v. injiziertem N-Allylnormorphin auf die nach Wezler u. Böger ermittelten Kreislaufgrößen beim Hund Karo (24 kg). *A* Atemfrequenz pro Minute, *P* Pulsfrequenz pro Minute, $V_s$ Schlagvolumen in Kubikzentimetern, $V_m$ Minutenvolumen in Kubikzentimetern, *BD* arterieller Blutdruck in mm Hg, *W* peripherer Widerstand in dyn · sec/cm$^5$, *E'* elastischer Widerstand in dyn/cm$^5$.

*b) Eukodal und Morphin.* Eukodal wurde in Dosen von 1—1,5 mg/kg innerhalb von 1 min i.v. verabfolgt. In fast allen Versuchen traten

anhaltende Bradykardie, Capillardruckanstieg, Zunahme des Pfotenvolumens und Vergrößerung der Volumenpulsamplitude ein. Der Blutdruck wurde nicht einheitlich beeinflußt; meistens konnte ein leichter Anstieg beobachtet werden (Abb. 2, 4a). Morphin in gleicher Dosierung wurde von den Tieren zum Teil schlecht vertragen (starker Blutdruckabfall, bei einem Hund Kreislaufkollaps), so daß die übrigen Versuche mit kleineren Dosen (0,6—0,7 mg/kg innerhalb 1 min i.v.) durchgeführt werden mußten. Hierbei konnten am Extremitätenkreislauf die gleichen Symptome wie nach 1 mg/kg Eukodal beobachtet werden, wenn auch in etwas schwächerem Maße. Der Blutdruck aber fiel fast immer steil ab und kehrte nur langsam zum Ausgangswert zurück. Gleichzeitig trat eine starke ebenfalls anhaltende Tachykardie auf (Abb. 3, 5a).

c) *Antagonismus von N-Allylnormorphin gegenüber Eukodal und Morphin.* Wurde den Hunden auf der Höhe der Eukodalwirkung (4 min nach der Eukodalinjektion) 0,1 mg/kg N-Allylnormorphin i.v. injiziert, so wurden sämtliche Eukodalwirkungen, sowohl die am peripheren Kreislaufgebiet als auch die Bradykardie, spätestens innerhalb von 3 min aufgehoben (Abb. 4b, 6). Ähnlich, allerdings nicht ganz so ausgeprägt, verhielt es sich mit der Morphinwirkung auf die Extremitätendurchblutung; dagegen kehrten der durch Morphin gesenkte Blutdruck sowie die Tachykardie in den Versuchen mit nachfolgender N-Allylnormorphininjektion nicht schneller zum Ausgangswert zurück als in den Versuchen ohne N-Allylnormorphin, auch nicht, wenn dieses höher (0,2 mg/kg) dosiert (Abb. 5b, 6, 7) und 3 min vor oder gleichzeitig mit der Morphininjektion verabreicht wurde.

Der Blutdruckabfall nach Morphin konnte auch durch vorherige Gabe von 0,5 mg/kg Atropin (als Dauerinfusion über 15 min i.v. verabreicht), das in dieser Dosierung die blutdrucksenkende Wirkung von 10—15 $\gamma$/kg Acetylcholin völlig aufhob, nicht beeinflußt werden, ließ sich aber mit einer ebenfalls als Dauerinfusion innerhalb von 15 min i.v. verabfolgten Dosis von 5—7 mg/kg des Antihistaminicums Ilvin deutlich abschwächen. Hierbei entsprach das Ausmaß der Abschwächung des Morphineffektes dem Abschwächungsgrad einer im selben Versuch vor und nach der Morphininjektion verabfolgten Histamindosis von gleicher depressorischer Wirksamkeit (10—15 $\gamma$/kg Histamin i.v.). Die Wirkung des Morphins auf den Extremitätenkreislauf wurde durch Ilvin nur undeutlich beeinflußt, die des Eukodals überhaupt nicht.

Im Hautquaddeltest am Menschen (3 Versuche an 2 Versuchspersonen) trat nach der intracutanen Injektion von 0,1 ml einer 1%igen Morphinhydrochloridlösung vom $p_H$ 4,9 eine typische Histaminreaktion (mittlere Quaddelgröße 10 min nach der Injektion 2,7 cm$^2$) auf, während die gleiche Dosis einer 1%igen Eukodallösung vom $p_H$ 5,1 nur eine Quaddel von im Mittel 0,6 cm$^2$ zur Folge hatte.

## Besprechung.

Die Versuche haben gezeigt, daß beim wachen Hund intravenös verabreichtes Morphin und Eukodal eine sehr ähnliche Wirkung auf die Extremitätendurchblutung entfalten, daß aber nur Morphin Blutdruck-

abfall und Tachykardie auslöst. Mit N-Allylnormorphin konnten wir die Wirkung auf die Durchblutung der Hundepfote aufheben. Dagegen war es uns nicht möglich, den von Morphin bewirkten Blutdruckabfall durch N-Allylnormorphin zu verhindern. Auch KEMPE ist dies an narkotisierten Hunden nicht gelungen. Im Gegensatz dazu konnten ORAHOVATS u. Mitarb. durch gleichzeitige intravenöse Verabfolgung von

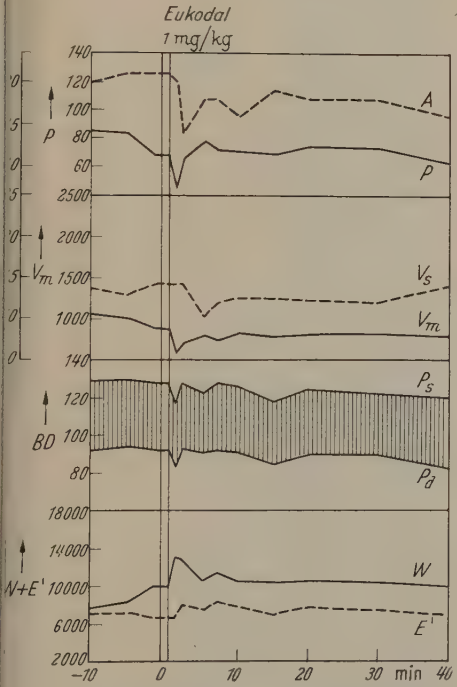



Abb. 2. Wirkung von i.v. injiziertem Eukodal auf die nach WEZLER u. BÖGER ermittelten Kreislaufgrößen beim Hund Karo (24 kg). Erläuterungen siehe Abb. 1.

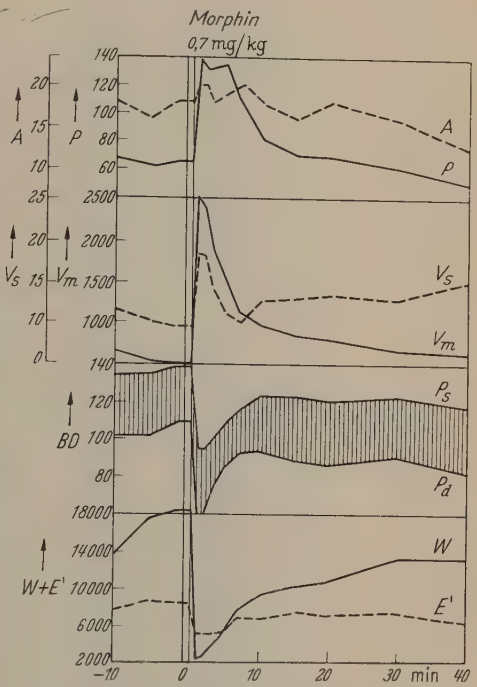



Abb. 3. Wirkung von i.v. injiziertem Morphin · HCl auf die nach WEZLER u. BÖGER ermittelten Kreislaufgrößen beim Hund Karo (24 kg). Erläuterungen siehe Abb. 1.

N-Allylnormorphin und Morphin die blutdrucksenkende Wirkung von letzterem an wachen und narkotisierten Hunden verhindern.

Unsere Beobachtung, daß die Blutdrucksenkung nur nach Morphin, nicht aber nach Eukodal auftrat und nicht durch N-Allylnormorphin, wohl aber durch Ilvin beeinflußt werden konnte, legte die Vermutung nahe, daß die für viele Opiate und deren synthetische Abkömmlinge nachgewiesene histaminfreisetzende Wirkung (FELDBERG u. PATON, EVANS u. Mitarb., NASMYTH u. STEWART) bei Eukodal sehr schwach sein müsse. Diese Vermutung wurde in daraufhin vorgenommenen Hautquaddeltesten bestätigt.

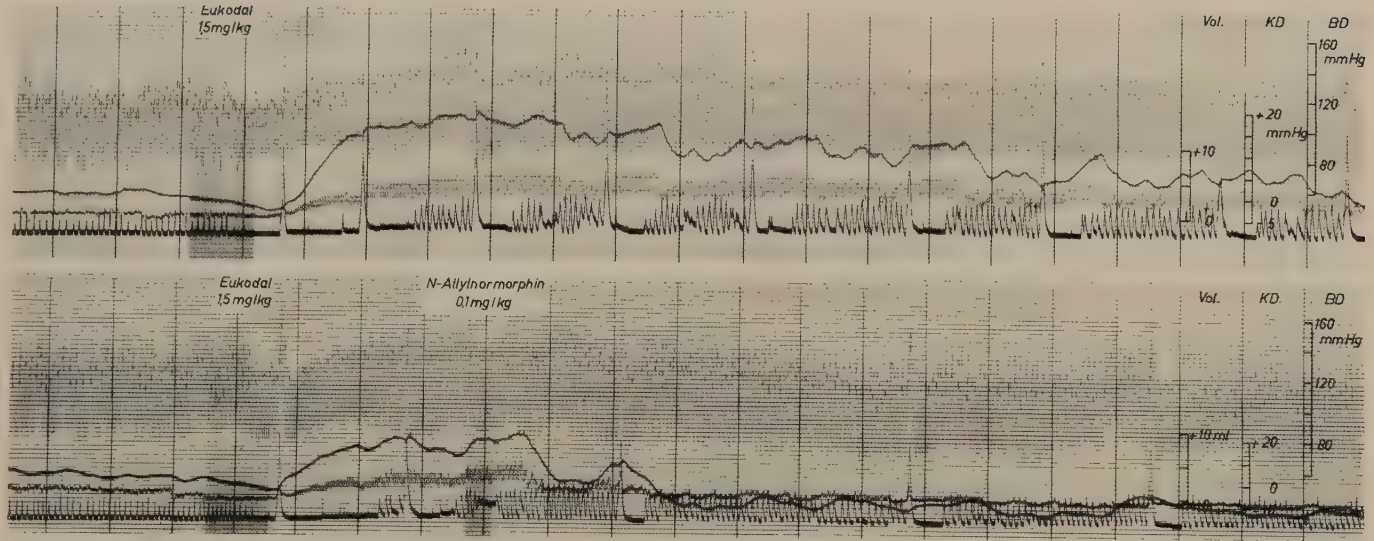



Abb. 4a und 4b. Hund Karo, 24 kg. Fortlaufende Registrierung (in der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten) des arteriellen Druckes (Eichung: BD), des Capillardruckes (Eichung: KD, *O* = Entlastungsdruck von 35 mm Hg), des Pfotenvolumens (Eichung: Vol., *O* – Ausgangsvolumen) und der Thoraxatmung, Zeitschreibung: Minuten. Wirkung von i.v. injiziertem Eukodal und Aufhebung der Eukodalwirkung durch 4 min später i.v. verabreichtes N-Allylnormorphin.

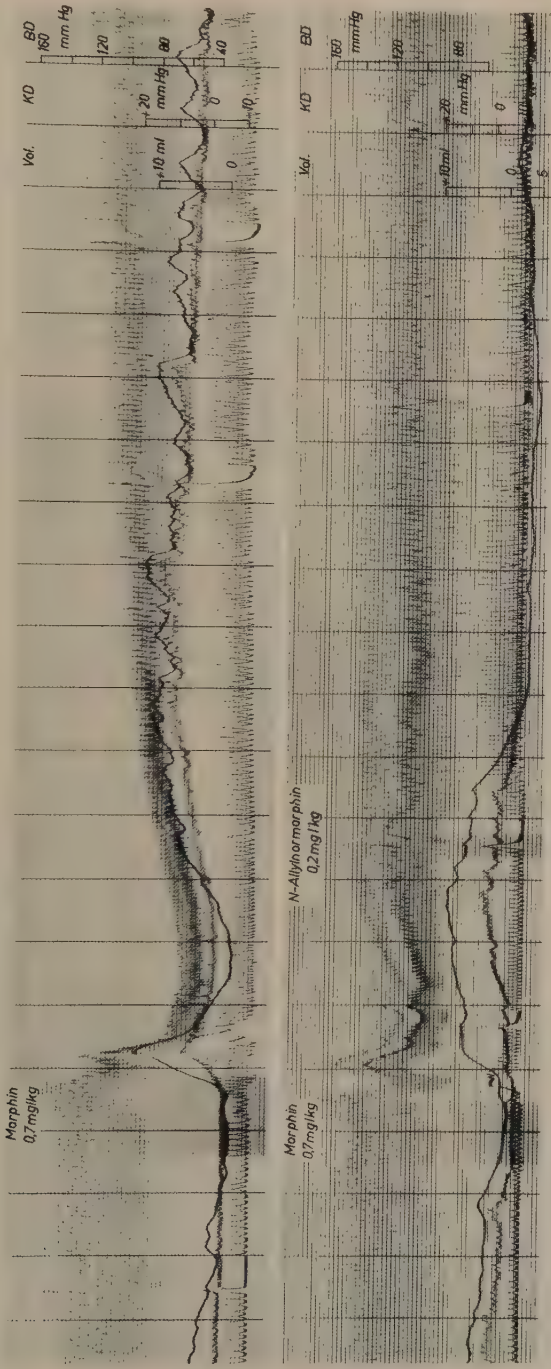



Abb. 5a und 5b. Hund Karo, 24 kg. Wirkung von i.v. injiziertem Morphin und Beeinflussung der Morphinwirkung durch 4 min später i.v. verabreichtes N-Allylnormorphin. Erläuterungen siehe Abb. 4.

Aus den Versuchen läßt sich somit der Schluß ziehen, daß N-Allylnormorphin die spezifische Morphinwirkung an peripheren Kreislaufabschnitten genau so wie die des Eukodals aufzuheben vermag, daß es aber weder die Histaminfreisetzung durch Morphin verhindern noch die Wirkung des freigesetzten Histamins abschwächen kann. Da N-Allylnormorphin in den in Frage kommenden Dosierungen (0,1—0,2 mg/kg) auf den Extremitätenkreislauf keinerlei Wirkung hat, kann man seine antagonistische Wirkung gegenüber Morphin und Eukodal als Verdrängungsreaktion (competitive inhibition) auffassen.

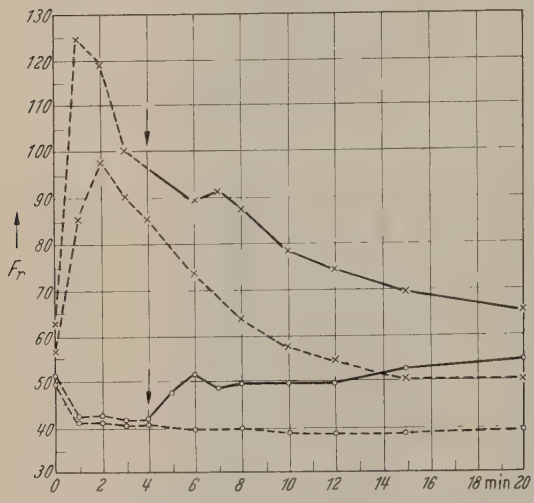



Abb. 6. Die nach Eukodal i. v. auftretende Bradykardie wird durch N-Allylnormorphin aufgehoben, die nach Morphin i.v. erfolgende Tachykardie dagegen nicht. Die gestrichelten Kurven zeigen die Wirkung von 1 mg/kg Eukodal i.v. (o) und von 0,7 mg/kg Morphin i.v. (x) auf die Pulsfrequenz pro Minute (Fr) von je 4 Hunden. Die ausgezogenen Linien zeigen den weiteren Verlauf der Pulsfrequenzkurven nach i.v. Injektion von N-Allylnmororphin (bei ↓ 0,1 mg/kg nach Eukodal, 0,2 mg/kg nach Morphin).

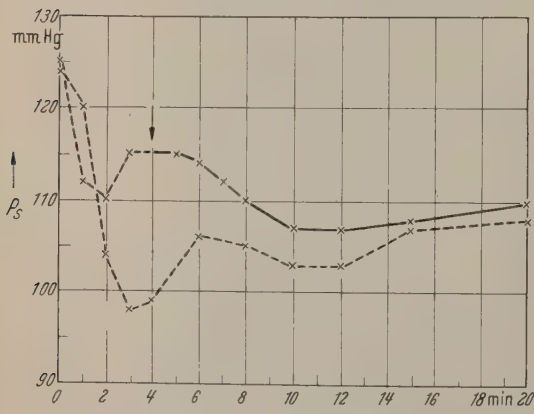



Abb. 7. Die nach Morphin i.v. erfolgende Blutdrucksenkung wird durch N-Allylnormorphin nicht beeinflußt. Die gestrichelten Kurven zeigen die Wirkung von 0,7 mg/kg Morphin i.v. auf den systolischen Blutdruck ($P_s$) von je 4 Hunden an verschiedenen Tagen. Die ausgezogene Linie zeigt den weiteren Verlauf der Blutdruckkurve nach der Gabe von 0,2 mg/kg N-Allylnormorphin i.v. (bei ↓).

Ein Widerspruch scheint zwischen der den peripheren Gesamtwiderstand erhöhenden Wirkung des Eukodals und seiner durchblutungsfördernden Wirkung an den Extremitäten zu bestehen. Als mögliche Erklärung kann die Beobachtung von Schmidt u. Livingston dienen, daß bei subcutaner Injektion von Morphin gleichzeitig mit der Erweiterung der Muskel- und Hautgefäße eine Verengerung der Blutgefäße des Splanchnicusgebietes eintritt; dieser Befund könnte insofern auch für das Eukodal Gültigkeit haben, als die Histaminfreisetzung nach subcutan injiziertem Morphin einen örtlichen Vorgang ohne Wirkung auf den Gesamtkreislauf darstellt. Auf diese Weise erklärt sich auch, daß

subcutan verabreichtes Morphin (6 mg/kg beim Hund nach Thauer u. Wezler) eine Wirkung hervorruft, die der einer intravenösen Eukodalinjektion entspricht.

## Zusammenfassung.

Versuche an wachen Carotisschlingenhunden haben folgendes ergeben:

1. N-Allylnormorphin hebt in kleinen Dosen, die selbst keine deutliche Wirkung ausüben, die durch intravenöse Injektion von Morphin oder von Eukodal bewirkte Erhöhung der Extremitätendurchblutung auf, beeinflußt aber nicht den durch Morphin hervorgerufenen Blutdruckabfall.

2. Durch Vorbehandlung der Tiere mit dem Antihistaminicum Ilvin kann die durch Morphin ausgelöste Blutdrucksenkung stark abgeschwächt werden. Seine die Extremitätendurchblutung fördernde Wirkung wird dagegen durch Ilvin nur geringgradig abgeschwächt; die Wirkung des Eukodals wird nicht beeinflußt.

3. Intravenös injiziertes Eukodal ruft im Gegensatz zu Morphin keinen Blutdruckabfall hervor. Hautquaddelteste am Menschen lieferten den Nebenbefund, daß Eukodal eine wesentlich schwächere histaminfreisetzende Wirkung besitzt als Morphin.

## Literatur.

Altschule, M. D.: Modern concepts of cardiovascular diseases **22**, 190 (1953), zit. n. Leimdorfer, A.: The action of codeine and morphine on cardiac arrhythmias Arch. internat. Pharmacodynamie **100**, 333 (1955). — Beckman, H.: Pharmacology in clinical Practice, Philadelphia and London 1952. — Burton, A. C.: The range and variability of the blood flow in the human fingers and the vasomotor regulation of body temperature. Amer. J. Physiol. **127**, 437 (1939). — van Egmond, A. A. J.: Über die Wirkung des Morphins auf das Herz. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **65**, 197 (1911). — Evans, A. G. J., P. A. Nasmyth and H. C. Stewart: The fall of blood pressure caused by intravenous morphine in the rat and in the cat. Brit. J. Pharmacol. **7**, 542 (1952). — Feldberg, W., and W. D. M. Paton: Release of histamine by morphine alkaloids. J. of Physiol. **111**, 19 P (1950). Release of histamine from skin and muscle in the cat by opium alkaloids and other histamine liberators. J. of Physiol. **114**, 490 (1951). — Kempe, H. D.: Untersuchungen zur Frage der strukturchemischen Verwandtschaft von Morphin und Papaverin mit Hilfe des Nalorphin-Antagonismus. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 541 (1954). — Mayer, R. F.: Vergleichende Beobachtungen über die Wirkung der wichtigsten Narcotica der Opiumgruppe. Münch. med. Wschr. **1927**, 1657. — Nasmyth, P. A., and H. C. Stewart: The release of histamine by opium alkaloids. J. of Physiol. **111**, 19 P (1950). — Orahovats, P. D., C. A. Winter and E. G. Lehman: Pharmacological studies of mixtures of narcotics and N-allylnormorphine. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 246 (1954). — Pfeiffer, C. C. in Drill, V.A.: Pharmacology in medicine, McGraw-Hill Book Comp., Inc., New York, Toronto,

London 1954, 17/7. — Schmidt, C. F., and A. E. Livingston: The action of morphine on the mammalian circulation. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **47**, 411 (1933). — Schnürch, O.: Die Vermeidung der Nebenerscheinungen des Morphins beim Hund. Wien. tierärztl. Mschr., **1942**, 58. — Schroeder, W.: Methodik der fortlaufenden Kreislaufanalyse am Hunde, I. Mitteilung: Die fortlaufende Blutdruckmessung. Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). — Methodik der fortlaufenden Messung des Venen-, Capillar- oder Arteriolendruckes in der vorderen Extremität des wachen Hundes. Z. Biol. **103**, 389 (1950). — Thauer, R., u. K. Wezler: Die Kreislaufwirkung der gebräuchlichsten tierexperimentellen Narkotica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 84 (1942). — Wezler, K., u. A. Böger: Über einen neuen Weg zur Bestimmung des absoluten Schlagvolumens des Herzens beim Menschen auf Grund der Windkesseltheorie und seine experimentelle Prüfung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 482 (1937).

Dr. E. Roesch, Darmstadt, Forschungslaboratorien d. E. Merck-AG, Pharmakol. Abtlg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 626, S. 527—531 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

# Zum Einfluß von somatotropem Hormon und Cortison auf den Verlauf einer experimentellen Trypanosomeninfektion (Trypanosoma cruzi).

Von
Siegmund Sommer.

*(Eingegangen am 4. August 1955.)*

Die in der Klinik gewonnene Erfahrung, daß Hypophysenvorderlappen- und Nebennierenrindenhormon den Verlauf von Infektionskrankheiten in günstigem oder ungünstigem Sinne beeinflussen können, hat zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen zur Folge gehabt. So ist auch der Einfluß von somatotropem Hormon (STH) bzw. von gleichzeitig gegebenem STH und Cortison auf den Verlauf experimenteller Infektionskrankheiten mehrfach untersucht worden. Jedoch wird ihre Wirkung recht verschieden beurteilt. Im folgenden wird über eigene diesbezügliche Untersuchungen berichtet. Sie wurden an trypanosomeninfizierten Mäusen durchgeführt.

Als Versuchstiere dienten 8—10 Wochen alte männliche Laboratoriumsmäuse (GN-Stamm, Kopenhagen) im Gewicht von 18—22 g, die subcutan mit je 50000 Parasiten (pro 20 g Maus) eines Trypanosoma cruzi-Stammes (Bayerwerk, Elberfeld) infiziert wurden. Infektionsmodus, Kontrolle und Beurteilung des Infektionsverlaufes wie in früheren Versuchen (Friebel).

Kristallisiertes, in physiol. Kochsalzlösung gut lösliches STH (a) der Firma Armour (Chicago, U. S.) und zwei amorphe Substanzen (b und c) der Firma Organon (Oss, Holland) wurden verwandt; Präparat b löste sich in physiol. Kochsalzlösung bis auf einen geringen Rückstand; Präparat c war zu 50% kristallin und frei von KCl; es löste sich bis auf einen geringen Rückstand in salzsaurer physiol. Kochsalzlösung von $p_H$ 5 auf. Subcutane Injektion in jeweils 0,5 cm³ Kochsalzlösung/20 g Maus alle 8 Std. Kontrolltiere erhielten 0,5 cm³ Lösungsmittel. Cortisonacetat in Form der handelsüblichen Suspension wurde gesondert täglich einmal in 0,2 cm³ Flüssigkeit/20 g Maus verabreicht.

## Ergebnisse.

Aus der Tab. 1 geht die Behandlung und Überlebenszeit in den einzelnen Versuchsgruppen hervor. In den Versuchsgruppen 1, 2, 5, 6 und 7 wurde die STH-Behandlung bis zum Tode fortgeführt. In den Gruppen 3 und 4 endete sie mit der Infektion.

Die Behandlung mit 0,5—50 mg/kg/Tag STH verkürzte die Überlebenszeit, wenn sie *während* der Erkrankung durchgeführt wurde.

Eine sichere Differenz ($\varepsilon = 0{,}27$) gegenüber unbehandelten Kontrolltieren besteht vom 13. Tag ab. Vorausgehende Behandlung blieb erfolglos.

*Tabelle 1.*

| Vers. Nr. | STH-Präparat | Substanz und Dosierung in mg/kg/die | Infektion u. Behandlungsbeginn | Zahl der Versuchstiere | Überlebende Tiere, 8—19 Tage nach Infektion | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 1 | b | 50,0 STH | gleichzeitig | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 5 | 2 | 0 | | | | |
| | | 5,0 STH | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 1 | 0 | | | | |
| | | 0,5 STH | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 3 | 1 | 0 | | | |
| | | Kontr. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 4 | 0 | | | |
| 2 | a | 50,0 STH | gleichzeitig | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 1 | 0 | | | |
| | | 5,0 STH | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 5 | 1 | 0 | | | |
| | | 0,5 STH | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 2 | 0 | | | |
| | | Kontr. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 5 | 2 | 1 | 0 | |
| 3 | b | 50,0 STH | 8 Tage lang vorbehandelt[1] | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 7 | 6 | 2 | 0 | | | |
| | | Kontr. | | 8 | 8 | 8 | 8 | 7 | 7 | 6 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| 4 | a | 50,0 STH | 8 Tage lang vorbehandelt[1] | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 8 | 6 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | | Kontr. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 7 | 5 | 1 | 0 | | |
| 5 | a | 10,0 STH | 3 Tage lang vorbehandelt | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 6 | 1 | 0 | | | | |
| | | 20,0 Cort. | | 10 | 8 | 6 | 2 | 0 | | | | | | | |
| | | 10,0 STH + 20,0 Cort. | | 10 | 10 | 10 | 6 | 2 | 0 | | | | | | |
| | | Kontr. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 8 | 7 | 2 | 2 | 1 | 0 | |
| 6 | c | 10,0 STH | gleichzeitig | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 4 | 0 | | | | |
| | | 20,0 Cort. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 0 | | | | | |
| | | 10,0 STH + 20,0 Cort. | | 10 | 8 | 8 | 8 | 8 | 4 | 0 | | | | | |
| | | 20,0 STH | | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 9 | 6 | 3 | 0 | | | |
| | | 20,0 STH + 20,0 Cort. | | 10 | 9 | 9 | 9 | 8 | 3 | 0 | | | | | |
| | | Kontr. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| 7 | c | 110,0 STH | gleichzeitig | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | 20,0 Cort. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 2 | 0 | | | | | |
| | | 110,0 STH + 20,0 Cort. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 2 | 0 | | | | | |
| | | Kontr. | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Behandlung und Überlebenszeit trypanosomenkranker Mäuse. In der 2. senkrechten Spalte sind STH-Präparate angegeben (a = Armour, b = Organon, amorph, c = Organon, halbkristallin). Weitere Einzelheiten über den Zeitpunkt der Infektion und das Behandlungsintervall im Text.

[1] Behandlung wurde mit Infektion eingestellt.

20 mg/kg/Tag Cortison reduzierten die Überlebenszeit stärker. Zunehmende Differenz gegenüber unbehandelten Tieren schon vom 8. Tag an; statistisch gesichert war sie am 12. Tag. Die gleichzeitige Behandlung mit Cortison und 10—110 mg/kg/Tag STH ergab keinen Unterschied in der Überlebenszeit gegenüber nur mit Cortison behandelten Mäusen. STH zeigte also keinen Einfluß auf die cortisonbedingte Verkürzung der Überlebenszeit, weder im fördernden noch im hemmenden Sinne.

Zum Einfluß von STH auf den Anstieg der Trypanosomenzahlen im Blut, auf das Körper- und Milzgewicht der Mäuse bei diesen Versuchen: Unbehandelte Tiere hatten am 8. Tag nach der Infektion in der Regel mehr als 1000 Trypanosomen im Kubikmillimeter Blut. Die Parasitenzahlen nahmen bis zum 13. Tag kontinuierlich zu (13750 $\pm$ 10350 im Kubikmillimeter) und fielen dann wieder ab. Die Behandlung mit STH veränderte diesen Verlauf nicht. Demgegenüber kam es nach Cortison zu der schon früher beschriebenen (Friebel) schnelleren Zunahme der Erregerzahlen bis zu 140000 $\pm$ 82010 im Kubikmillimeter. Ein Abfall wurde hier nicht beobachtet. Bei den gleichzeitig mit STH und Cortison behandelten Tieren wurden am 11., 12. und 13. Krankheitstag etwas kleinere Trypanosomenzahlen gefunden, eine sichere Differenz bestand jedoch nur am 12. Tag; die Förderung der Parasitenvermehrung durch Cortison wurde nur unwesentlich abgeschwächt.

STH-behandelte Mäuse nahmen bei deutlich vermehrtem Wassergehalt der Gewebe stark an Gewicht zu; nach 12tägiger Gabe von 110 mg/kg durchschnittlich 7,2 g. Der Anstieg entsprach in etwa der aus der Literatur bekannten Größenordnung, obwohl es sich um kranke Tiere handelte. Cortison-behandelte Trypanosomenmäuse verloren im gleichen Zeitraum durchschnittlich 0,7 g. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Cortison und 110 mg/kg STH kam es zu einem ähnlichen Gewichtsanstieg (durchschnittlich 2,3 g) wie bei unbehandelten Kontrollen (durchschnittlich 3,1 g).

Die Milzgewichte der mit STH behandelten Tiere aus den Versuchsgruppen 1, 3, 4, 6 und 7 der Tab. 1 (STH-Präparate b und c) waren nicht erhöht. Bei den Versuchsgruppen 2 und 5 (STH-Präparat a) wurde aber eine gesicherte Zunahme gefunden, wenn wenigstens 10 mg/kg STH verabreicht worden waren. Cortison reduzierte das Milzgewicht erheblich. Tiere, die mit STH und Cortison behandelt worden waren, hatten höhere Milzgewichte als cortisonbehandelte. Aber nur in den Versuchsgruppen 5 und 7 zeigte sich eine sichere Differenz. Präparat a reduzierte bereits bei 10 mg/kg/Tag den Cortisoneffekt, Präparat c erst bei 110 mg/kg/Tag (Tab. 2).

## Besprechung der Ergebnisse.

Über einen günstigen Einfluß von STH auf tierexperimentelle Infektionen berichtet Lucherini, der nach STH-Behandlung einen mil-

deren Verlauf der Meerschweinchentuberkulose beobachtete. Abweichend hiervon fand Scherr, daß STH die Moniliasis der Maus bei männlichen Tieren, die schwach infiziert wurden, fördert, bei weiblichen Tieren unter gleichen Bedingungen hemmt; bei starker Infektion kam es zu umgekehrten Ergebnissen. Pavilanis sah bei der Coxackie-Virus-Erkrankung

*Tabelle 2.*

| Präparat und Dosierung in mg/kg/die | Versuchsgruppe Nr. | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 Präp. b | 2 Präp. a | 3 Präp. b | 4 Präp. a | 5 Präp. a | 6 Präp. c | 7 Präp. c |
| 0,5 STH | 95,7 (10) (± 19,68) | 134,3 (10) (± 36,80) | | | | | |
| 5,0 STH | 115,6 (8) (± 25,86) | 161,1 (10) (± 28,49) | | | | | |
| 10,0 STH | | | | | 168,6 (10) (± 44,62) | 96,4 (10) (± 18,79) | |
| 20,0 STH | | | | | | 100,1 (10) (± 23,0) | |
| 50,0 STH | 113,4 (10) (± 21,74) | 172,6 (10) (± 39,9) | 92,1 (8) (± 13,3) | 77,7 (10) (± 8,47) | | | |
| 110,0 STH | | | | | | | 123,5 (1 (± 24, |
| 20,0 Cortison | | | | | 30,7 (10) (± 17,18) | 38,4 (10) (± 17,12) | 40,4 (1 (± 6,6 |
| 20,0 Cortison + 10,0 STH | | | | | 45,8 (10) (± 9,05) | 31,5 (10) (± 13,60) | |
| 20,0 Cortison + 20,0 STH | | | | | | 46,1 (10) (± 17,42) | |
| 20,0 Cortison + 110,0 STH | | | | | | | 62,5 (1 (± 19,8 |

Durchschnittliche Milzgewichte der mit Hormon behandelten Tiere gegenüber allen (zusam mengefaßten) Kontrollen = 100 (± 26,8). Hinter den Milzgewichten in Klammern die Anzahl d ausgewerteten Tiere. Unter den Milzgewichten in (±) die Standardabweichung $\sigma$.

von Mäusen keine Veränderung des Krankheitsverlaufs. Kass beobachtete aber bei Pneumokokken-infizierten Mäusen ausschließlich Resistenzminderung. Unsere eigenen Versuche führten zu ähnlichen Ergebnissen wie die von Kass. Der deletäre Einfluß von Cortison auf subakut verlaufende Infektionskrankheiten wird nach Lucherini (Meerschweinchentuberkulose) durch STH aufgehoben. Selye und Ducommum konnten unter Cortisoneinwirkung spontan auftretende Lungenabszesse mit nachfolgender Bakteriämie bei Ratten durch STH verhüten. Scherr (Moniliasis der Maus) kam bei gleichzeitiger Gabe von Cortison und STH zu unterschiedlichen Ergebnissen in Abhängigkeit vom Geschlecht der

Tiere und der Stärke der Infektion. Pavilanis (Coxackie-Virus-Erkrankung der Maus) sah bei gleichzeitiger Behandlung keine Veränderung der durch Cortison provozierten Krankheit. Ebenso konnte Kass den Cortisoneffekt auf die Pneumokokkeninfektion der Maus durch STH nicht aufheben. Die eigenen Versuche stehen mit den Angaben von Pavilanis und Kass (Pneumokokken- und Virus-Infektion der Maus) in Übereinstimmung: die durch Cortison bedingte Verschlechterung konnte durch STH nicht aufgehalten werden.

Obwohl STH die Überlebenszeit der trypanosomenkranken Mäuse verkürzt und hinsichtlich dieser Wirkung mit Cortison übereinstimmt, bewirkt es doch keine Zunahme der im Blut nachgewiesenen Trypanosomenzahlen. Der Mechanismus seines deletären Einflusses ist ein anderer. Ein Antagonismus zum Cortison besteht hinsichtlich der STH-Wirkung auf das Körper- und Milzgewicht, doch bleibt offen, wie er im einzelnen zustande kommt. Die Beziehungen zwischen STH und Cortison sind demnach vielfältig und in ihren Einzelheiten wohl noch nicht übersehbar.

## Zusammenfassung.

STH-Behandlung verkürzt die Überlebenszeit trypanosomeninfizierter Mäuse. Die Wirkung einer Cortisonbehandlung, die in noch stärkerem Maße zum vorzeitigen Absterben führt, wird durch gleichzeitige Gaben von STH weder gesteigert noch abgeschwächt. Ebenso wird die cortisonbedingte ungewöhnliche Zunahme der Parasitenzahlen im Blut durch STH nicht verändert. In dieser Hinsicht läßt sich weder synergistisches noch antagonistisches Verhalten beider Hormone feststellen. Demgegenüber gleicht STH andere Cortisoneffekte, wie Milzverkleinerung und Abnahme des Körpergewichtes, zum Teil aus.

## Literatur.

Ducommum, P., u. S. Ducommum: Ann. d' Endocrin. **14**, 765 (1953). — Friebel, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 515 u. 536 (1952). — Kass, E. H., M. M. Lundgren u. M. Finland: Ann. New York Acad. Sci. **56**, 765 (1953). — Lucherini, T., L. Schiaretti, T. Marino, M. Lucchesi: Policlinico (sec. med.) LX, 1 (1953). Pavilanis, V., u. D. Dufour: XIX. Congr. internat. physiol. Montreal 1953, 668. — Scherr, G. H.: Congr. Internat. Microbiol. 1953. — Selye, H.: Canad. Med. Assoc. J. **64** 489 (1951).

Dr. Siegmund Sommer, Bonn, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 532—546 (1955).

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel.

# Die Abhängigkeit der Größe und Form der Zeit-Wirkungsfläche von Dosis und Resorptionsgröße bei Testosteronestern.

Von
R. Meier und E. Tschopp.

Mit 7 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 15. Juli 1955.)*

In vorhergehenden Arbeiten haben wir die Abhängigkeit des Wirkungsanstieges und Wirkungsabfalles von Dosierung, Resorptionsgröße und Resorptionsdauer auf Grund neuerer Befunde bei Testosteronestern dargelegt[11, 4, 5]. Trotzdem einzelne Schlußfolgerungen ohne die Bestimmung der Konzentration der Stoffe im Organismus eine gewisse Unsicherheit behalten, ist die Beurteilung der Wirkung als Folge der oben genannten Eigenschaften der gegebenen Substanz weitgehend möglich. Dies beruht zum Teil darauf, daß zwangsläufige Zusammenhänge zwischen Wirkungsanstieg und Wirkungsabfall bestehen. Nach Abklärung dieser Fragen läßt sich auch das Problem, wie bei der an sich wellenartig ansteigenden und abfallenden Wirkung einzelner Dosen eine konstante Dauerwirkung entwickelt werden kann, in allgemeiner Weise behandeln. Dies ist sowohl theoretisch wie praktisch von besonderer Wichtigkeit.

Die gesamte Wirkungsgröße ist hierfür von wesentlicher Bedeutung. Sie kann als Wirkungsfläche zur Beurteilung verwendet werden, die als Wirkungsmaß besonders von K. Miescher u. a. gebraucht wurde[6, 7, 8]. Für die Beurteilung der Erzielung eines konstanten Wirkungsniveaus genügt aber diese Auswertung allein nicht, hierfür ist von noch entscheidenderer Bedeutung die Form der Wirkungsfläche. Wir haben die hierfür maßgebenden Gründe bereits in früheren Arbeiten mehrfach dargelegt[5, 9].

Ein gradliniges Wirkungsniveau kann nur dann erzielt werden, wenn Größe und Form von Wirkungsflächen angepaßt werden können. Es wird eine an sich genügende Wirkungsfläche, deren Höhepunkt aber in einem relativ späten Zeitpunkt das nötige Niveau nur kurzdauernd erreicht, wie es bei lang wirkenden Verbindungen eben der Fall ist, nicht für Erhaltung einer bestimmten Wirkungshöhe ausgenützt werden können, wenn nicht die fehlenden notwendigen Teile der Fläche durch zusätzliche Dosen zur gradlinigen Wirkungshöhe ergänzt werden.

Für die Erzielung eines gleichmäßigen Wirkungsniveaus besteht, wenn man von der in kurzen Intervallen wiederholten Applikation absieht, nur die Möglichkeit, Wirkungsflächen so miteinander zu kombinieren, daß möglichst angenähert eine langanhaltende gleichmäßige Wirkung erreicht wird. Das vollständige „Ideal" kann vorläufig deswegen nicht leicht erreicht werden, weil die Verbindungen sämtlich einen „Resorptionstypus" und damit ein Wirkungspotential haben, bei dem von einem primären Maximum ein Abfall erfolgt.

Der erste Schritt zur Behandlung des Problems ist die Abklärung, in welcher Weise Form und Fläche der Wirkung durch Variation der Dosis und Resorptionsgröße abgewandelt werden können.

## Methode.

Es wurde so vorgegangen, daß die gleiche Dosis von Testosteronestern Kapaunen injiziert und das Kammwachstum gemessen wurde, wie es in früheren Arbeiten schon beschrieben worden ist[10]. Alle Befunde beziehen sich auf die Wirkung einer einmaligen i. m. Applikation der geprüften Verbindungen. Jeder angegebene Befund ist der Durchschnittswert aus 5—10 Versuchen. Es wurden die Wirkungsfläche und die die „Form" derselben charakterisierenden Größen, das Wirkungsmaximum, die Zeitdauer bis zur Erreichung desselben und die gesamte Wirkungsdauer bestimmt. (Bei starkem Kammwachstum geht der Kamm nicht vollkommen auf den Ausgangspunkt zurück, jedenfalls nicht innerhalb einer nützlichen Frist. Wir haben deshalb den Wert unterhalb der Geraden, die vom Ausgangspunkt zu demjenigen Punkte geht, wo die resistierende Kammgröße parallele Werte zur Abszissen-Achse annimmt, vernachlässigt. Dadurch entstehen Fehler, die wenige Prozente betragen mögen.)

Für die Auswertung benützen wir zum Teil die gleichen Befunde, die bereits für die Analyse des Wirkungsanstiegs und Wirkungsabfalles gedient haben[11, 4]. Wir werden uns aber vor allem damit befassen, die früher für ausgewählte Fälle aufgestellten Beziehungen für einen größeren Dosenbereich abzuleiten.

### *I. Resorptionsgröße und Wirkungsfläche.*

Für die Besprechung der vorliegenden Fragen ziehen wir vor, die zu allgemeinen Schlußfolgerungen geeigneten Ergebnisse zunächst zu behandeln; auf Grund derselben wird sich die Interpretation der Befunde mit verschiedenen Stoffen und Präparaten in einfacher Weise ergeben.

Als wichtigen Ausgangspunkt erörtern wir zunächst die Abhängigkeit der Wirkung vom Ablauf der Resorption bei gleicher Dosis. Derartige Verhältnisse sind bereits früher in eigenen Arbeiten diskutiert worden[5], doch wurde nur die Dauer von „Schwellenwirkungen", aber nicht gleichzeitig die Stärke der Wirkung bestimmt. Dies ist nur ein Spezialfall der vorliegenden Situation.

Die Lösung unseres Problems muß sich aus der Beantwortung der Frage ergeben, wie verhalten sich Form und Größe der Wirkungsfläche bei Variation der Resorption von „unendlich langsamem zu unendlich

schnellem" Ablauf derselben. Diese Untersuchung wird zunächst für eine einzige konstante Dosis durchgeführt, um die grundsätzlichen Verhältnisse zu ermitteln.

Die für die Untersuchung gewählte Verbindung ist Testosteronisobutyrat, da bei diesem leicht Kristalle verschiedener Größe erhalten werden können; doch gelten die Befunde sinngemäß für analoge Verhältnisse anderer Ester. Die Dosis ist 10 mg/Tier; diese ergibt eine gut meßbare Wirkung. Die Resorptionsgröße wird durch die verschiedene Größe der verwendeten Kristalle verändert. Die Kristallgröße variiert von der Größe 0,05—0,1 mm bis zur Größe von 1,5 mm Seitenlänge. Die letztere entspricht für die angewandte Dosis einem, bzw. wenigen Kristallen. Diese Größe bildet praktisch das Maximum der Resorptionsverlangsamung in diesem Falle. Die Kristalle unter 0,05—0,1 mm sind nicht mehr sicher in konstanter Form zu erhalten. Um aber die Resorption noch weiter zu beschleunigen, wurde die sonst an einer Stelle applizierte Dosis auf 10 Stellen verteilt. Dadurch wird ebenfalls eine Beschleunigung der Resorption erzielt, wie schon in früheren Untersuchungen dargelegt, die etwa derjenigen durch „weitere Verkleinerung der Kristallgröße" entsprechen würde. Es zeigt diese Beobachtung außerdem, daß die abgeleiteten Zusammenhänge streng nur für die Applikation der Gesamtdosis an gleicher Stelle in gleicher Form gelten. Dies ändert nichts an der grundsätzlichen Richtigkeit der Schlußfolgerungen.

Aus den in Abb. 1 dargelegten Versuchsergebnissen ergibt sich, daß die Änderung der Resorption bei gleicher Dosis eine gesetzmäßige Variation von Form und Größe der Wirkungsfläche mit sich bringt. Ist bei einer an sich „hohen" Dosis, wie sie hier gewählt wurde, die Resorption sehr rasch, so wird eine kleine Wirkungsfläche mit „optimalem Anstieg" und entsprechendem Abfall erzielt. Naturgemäß muß bei „unendlich rascher" Resorption, vorausgesetzt, daß die resorbierte Menge gleich rasch umgesetzt wird, die Wirkung null werden. Die Verlangsamung der Resorption bei gleicher Dosis bringt die Wirkungsfläche zu einem Optimum bei „optimalem" Wirkungsanstieg, -maximum und -abfall. Die bis zu dieser Resorptionsgröße erzielten Wirkungsflächen sind der Form nach ähnlich. Wird die Resorption weiter verlangsamt, so wird die Wirkungsfläche zunächst weiter vergrößert bei verlangsamtem Wirkungsanstieg und Wirkungsabfall, aber noch erhaltenem Maximum. Bei noch stärkerer Verlangsamung der Resorption sinken Wirkungsanstieg, Wirkungsmaximum und Wirkungsfläche allmählich zur Abszissenachse ab. Wenn eine überhaupt unwirksame Schwellendosis ohne Anhäufung im Organismus resorbiert wird, muß die Wirkung null werden.

Bei niedrigerer oder höherer Dosis ändern sich die Kurvenscharen in einer Weise, die aus dem vorstehenden Beispiel ohne weiteres abgeleitet werden kann.

Das Verhalten der Wirkung läßt sich auf Grund der theoretisch ermittelten Resorptionskurven bis zu einem gewissen Grade interpretieren. Wir verwenden für diese Ableitung die früher rechnerisch ermittelten Resorptionskurven[2, 3]. Wir haben versucht, die Menge der im Gewebe liegenbleibenden Kristalle ebenfalls zu bestimmen, doch ergeben sich hier gewisse Schwierigkeiten. Wir werden zu einem späteren Zeitpunkt auf diese Frage zurückkommen. Wir können festhalten, daß im Prinzip die erhaltenen Kurven mit den errechneten übereinstimmen, wenn sie auch quantitativ in einzelnen Punkten abweichen. Für die Erörterung

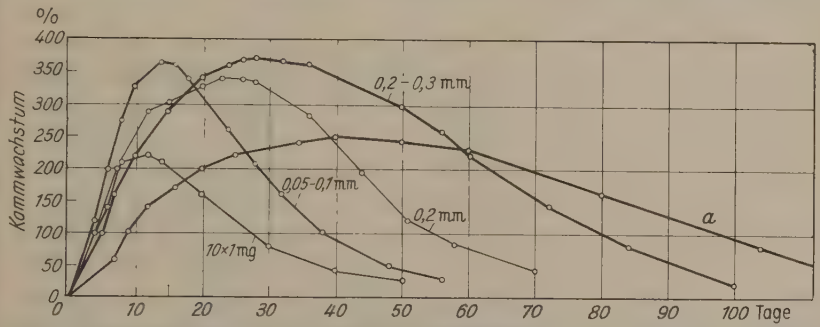



Abb. 1. Abhängigkeit der Form und Größe der Wirkungsfläche von der Dimension der injizierten Testosteronester-Kristalle Testosteron-isobutyrat 10 mg/Tier als „Depot"-Injektion an Kapaunen. Die für die verschiedenen Kristallsuspensionen maßgebende Kristallkantenlänge ist neben die entsprechenden Kurven eingetragen. *a* bezeichnet die Wirkung des größten Kristalls. Abszisse: Wirkungsdauer in Tagen; Ordinate: Wirkungshöhe in % Kammwachstum.

des grundsätzlichen Zusammenhanges von Resorptionsgröße mit der Wirkung ist dies durchaus genügend. Die auf Grund der angenommenen Resorptionsgröße zu treffenden Entscheidungen sind ihrem Charakter nach ohne weiteres gültig.

Die Resorptionskurven sind hyperboloide Kurven. Die Höhe ihres Anfangspunktes und die Steilheit des Abfalles werden bei gleicher Dosis direkt durch die Kristallgröße bestimmt, ebenso die Lebensdauer der Kristalle. Aus diesen Werten kann angenähert die Zeitdauer ermittelt werden, in der gewisse Schwellendosen zur Verfügung stehen. Auf Grund des Vergleiches der Resorptionskurven mit der erzielten Wirkung kann angenommen werden, daß kurz nach Eintritt des Wirkungsabfalles eine für die Erhaltung der Wirkung auf dem maximal erreichten Niveau nicht mehr genügende Menge Wirkstoff zur Verfügung steht, und damit ein weiterer Anhaltspunkt für den „Verlauf" der Resorptionskurve erhalten werden.

Die Analyse der Beziehung zwischen Resorptionsgröße und Wirkung muß sich auf Grund der Abhängigkeit der Wirkungscharakteristiken von der Resorptionsgröße ergeben. Da zwischen der Resorptionsgröße und der Kristallgröße eine einfache inverse Beziehung besteht, wählen wir als

Bezugsgröße zunächst die Kantenlänge der Kristalle und ermitteln folgende Verhältnisse:

1. Kristallgröße: Wirkungsmaximum
2. Kristallgröße: Wirkungsfläche (Anstiegfläche u. Abfallfläche).
3. Kristallgröße: Zeitdauer bis zur Erreichung des Maximums und gesamte Wirkungsdauer.

Die Kurven ergeben sehr eindeutig, wie die Wirkungsfläche von zwei Koordinaten verschiedenen Charakters bestimmt wird, der Dauer und der Höhe. Abb. 2.

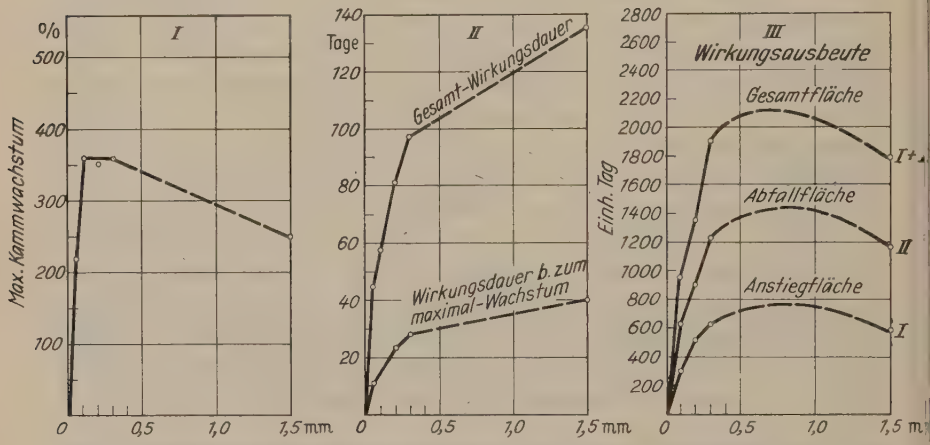



Abb. 2. Abhängigkeit der Wirkungshöhe, der Wirkungsdauer und der Wirkungsausbeute von der Kristalldimension des injizierten Testosteronesters. Abszisse: Kristalldimension (Kantenlänge in mm); Ordinate: I Wirkungshöhe in % Kammwachstum gegenüber Kontrolle, II Wirkungsdauer in Tagen, III Wirkungsausbeute in Kammwachstumseinheiten.

Während die Kurve der Dauer bis zur maximalen Kristallgröße ansteigend verläuft, — sie geht gewissermaßen von null zu „unendlich" — zeigt das Wirkungsmaximum einen Anstieg bis zu einem Maximum bei einer mittleren Resorptionsgröße, und dann einen Abfall. Die Kurve der Wirkungsfläche, die aus den „beiden Koordinaten" entsteht, zeigt dementsprechend einen Anstieg bis zu einem Maximum und anschließend einen Abfall. Es ist somit eindeutig, daß ein verschiedenes Verhalten von Wirkungshöhe zu Wirkungsdauer in Abhängigkeit von der „Resorptionsgröße" das besondere Verhalten der Wirkungsfläche bei dieser Art von Präparaten bedingt.

Etwas anders verhält sich die Wirkungsdauer bei einer mittleren Wirkungshöhe. Hier sind zwei Werte zu berücksichtigen, derjenige vom „erreichten" Wirkungswert bis zum gleichen Wert auf dem abfallenden Teil der Kurve und der von der Ordinate bis zum gleichen Punkt. Der erste gibt die der Schwellenwirkung entsprechende Wirkungsdauer, bei

der vom Nullpunkt erst das Wirkungsniveau erreicht werden muß, der zweite die gesamte Wirkungsdauer der gegebenen Dosis, die dann als Bezugsgröße in Frage kommt, wenn die Wirkung zur Fortsetzung des bereits vorher erreichten Wirkungsniveaus dient. Es wird später auf diese Frage zurückzukommen sein.

Es ergibt sich aus den vorgelegten Befunden, in welcher Weise die Wirkung durch Änderung der Resorption allein abgewandelt werden kann.

Als wesentliches Ergebnis ist festzuhalten, daß nur bei einer Dosis und bei einer bestimmten Resorptionsform eine „optimale Ausnützung" gegeben ist. Dabei ist zu unterscheiden zwischen derjenigen optimalen Form, die gleichzeitig einen optimalen Wirkungsanstieg ergibt und derjenigen, die, unabhängig vom Anstieg und Maximum, die größte Wirkungsfläche ergibt. Die beiden Wirkungen werden durch verschiedene Resorptionsgrößen erhalten. Es ist aus diesen Befunden zu ersehen, daß die für die Erhaltung eines konstanten Wirkungsniveaus notwendige lang anhaltende Wirkung nicht für beliebige Verhältnisse mit einem schnellen Wirkungsanstieg gekoppelt sein kann. Dies ist nur der Fall, wenn die für das zu erreichende Wirkungsniveau notwendige Dosis einer Anwendungsform so groß sein muß, daß sie den entsprechenden Wirkungsanstieg erreicht. Es wird für Präparate mit lang dauernder Wirkung nur für starke Wirkungsintensitäten der Fall sein. Für niedere Schwellenwerte wird deswegen der langsame Anstieg einer langwirkenden Applikationsform durch die Zugabe einer schnell und dementsprechend kurzwirkenden Form zu ergänzen sein.

Die Ursache dieses immerhin bemerkenswerten Verhaltens muß zum Teil darin zu suchen sein, daß für einen Anstieg mit rascher Geschwindigkeit eine höhere mittlere Schwellendosis notwendig ist als für die gleiche Wirkungshöhe bei langsamer Anstiegsgeschwindigkeit. Dadurch wird bedingt, daß bei gleicher Höhe eine größere Wirkungsfläche bei gleicher Dosis erhalten wird. Es ist denkbar, daß für dieses Verhalten indirekt von der Resorptionsgröße abhängige Faktoren, z. B. die Objektreaktivität und z. B. die Sättigung des Organismus im Verhältnis zur Resorption maßgebend sind. Auf diesen Punkt wird im weiteren Verlauf der Diskussion zurückzukommen sein.

### *II. Dosis und Wirkungsfläche.*

Der zweite Teil des Problems liegt darin, in welcher Weise die Wirkungsfläche von der Dosis abhängig ist. Wir wählen hierfür die gleiche Substanz wie für den ersten Fall und von *ihr zwei Formen*: *eine mit relativ rascher Resorption und eine andere mit langsamerer Resorption*. Dementsprechend werden Testosteronisobutyrat-Kristallsuspensionen von 0,05 bis 0,1 mm Kantenlänge und Kristallsuspensionen

von 0,2 mm Kantenlänge verwendet. Die Versuchsanordnung ist im Prinzip die gleiche wie in der vorher besprochenen Versuchsgruppe. Eine einmalige Dosis wird i. m. dem Kapaun injiziert und zwar jeweils 1 bzw. 2,5 mg und 10 mg der ausgewählten Kristallform.

Entsprechend dem von der Größe der Dosis abhängigen verschiedenen Wirkungsanstieg und -abfall ändern sich sowohl die Größe als auch die Form der Wirkungsfläche. Abb. 3.

Bei der verwendeten Kristallgröße von 0,05—0,1 mm ist bei kleiner Dosis der Wirkungsanstieg nicht „optimal", d. h. er erreicht noch nicht die maximale Wachstumsgeschwindigkeit, erst bei 10 mg wird der Anstieg optimal.

In entsprechender Weise ändern sich ebenfalls Wirkungsmaximum und Wirkungsdauer. Bei einer Kristallgröße von 0,2 mm ist bei kleiner Dosis der Wirkungsanstieg noch ungünstiger als bei der kleineren Kristallform. Mit einer Dosis von 10 mg ist der Wirkungsanstieg steiler, aber nicht ganz optimal. Dagegen ist das Wirkungsmaximum erhöht und die Wirkungsdauer entschieden verlängert.

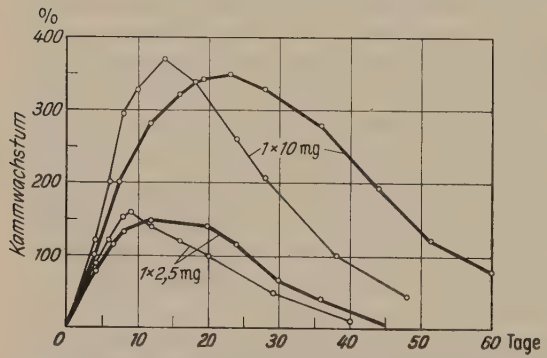



Abb. 3. Abhängigkeit der Form und der Größe der Wirkungsfläche von der injizierten Dosis zwei verschiedener Kristallsuspensionen des Testosteron-isobutyrats. Dünne Kurve 0,05—0,1 mm Kantenlänge 2,5 mg i. m., 10 mg i. m., Dicke Kurve 0,2 mm Kantenlänge 2,5 mg i. m., 10 mg i. m.

Die Interpretation des Wirkungsverhaltens im Verhältnis zur Resorptionsgröße gibt ihre allgemeine Bedeutung. Wir nehmen wiederum die früher errechnete Resorptionsgröße bei verschiedener Dosis als im Prinzip richtig an. Bei gleicher Kristallgröße ist die Lebensdauer der Kristalle identisch, d. h. die Wirkungsgröße hängt ausschließlich von der Dosis ab. Alle Charakteristiken müssen damit theoretisch aus der durch die Dosis bedingten Resorptionskurve abgeleitet werden können. Die Auswertung der Kurven erfolgt zweckmäßig nach dem bereits bei der ersten Gruppe angewandten Verfahren, so daß Wirkungsfläche, Wirkungsmaximum und Wirkungsdauer in Beziehung zur Dosis gesetzt werden. Abb. 4.

Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der Dosis und der Wirkungsfläche, dem Wirkungsmaximum und der Dauer des Effektes bis zur Erreichung des Wirkungsmaximums und der Gesamtdauer im Bereich der angewandten Dosen.

Aus dem Verhältnis der entsprechenden Kurven für kleinere und größere Kristalle ergibt sich, daß Fußpunkt und Neigung der erhaltenen Kurven verschieden sind. Bei der Kurve des maximalen Wachstums ist bevorzugt der Fußpunkt, bei der Dauer bis zur Erreichung des Maximums und bei der Wirkungsfläche Fußpunkt und Neigung geändert. Diese Feststellung belegt wiederum die verschiedene Bedeutung der beiden Faktoren Dauer und Wirkungsmaximum für das Zustandekommen der Wirkungsfläche bei verschiedener Resorptionsgröße, wie im ersten Teil dieser Arbeit dargelegt wurde.

Die Werte zeigen weiter, daß die vorliegenden Gesetzmäßigkeiten, die zwischen der Dosis und der Wirkung bestehen, auf Grund derartiger Be-

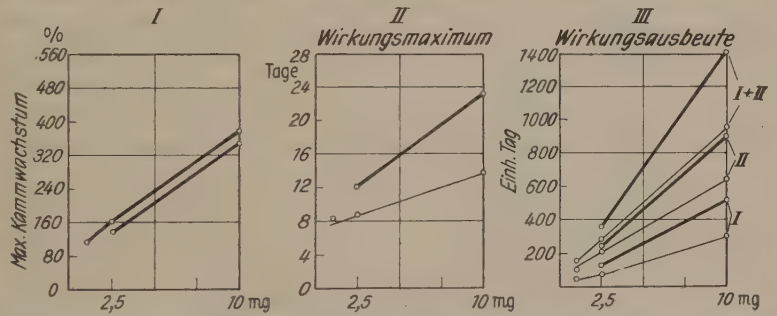



Abb. 4. Abhängigkeit der Wirkungshöhe (I) in % Kammwachstum, der Dauer bis zur Erreichung des Wirkungsmaximums (II) und der Wirkungsausbeute (III) von der injizierten Dosis zwei verschiedener Kristallsuspensionen des Testosteron-isobutyrats. Dünne Kurve 0,05—0,1 mm Kantenlänge 1,0 mg i.m., 2,5 mg i.m., 10 mg i.m., Dicke Kurve 0,2 mm Kantenlänge 2,5 mg i.m., 10 mg i.m.

funde eindeutig abgeleitet werden können. Es ist mit diesen Befunden und den im ersten Teil besprochenen die Unterlage gegeben, die ermöglicht, sowohl Änderung der Dosis wie Änderung der Kristallgröße in ihrer Bedeutung für das Zustandekommen der Wirkungsfläche und Form zu charakterisieren.

Etwas anders verhält sich die Beurteilung der Wirkungsdauer, wenn nicht die Dauer vom Moment der Applikation, sondern auf einem bestimmten Wirkungsniveau gemessen wird. Dabei besteht ein Unterschied, wenn man die Wirkungsdauer bei einer bestimmten Größe als Gesamtdauer von der Ordinate aus oder nur vom Zeitpunkt der schon erreichten Wirkungshöhe mißt. Die Auswertung bestätigt im Prinzip frühere Angaben, die zeigten, daß die Wirkungsdauer bei gegebener Schwelle mit steigender Dosis des gleichen Präparates progressiv immer weniger zunimmt. Nimmt man z. B. die Wirkung von 100% Kammwachstum, so beträgt die Wirkungsdauer auf dieser Größe bei Verwendung kleinerer Kristalle für 2,5 mg etwa 21 Tage, für 10 mg etwa 38 Tage, im Falle größerer Kristalle für 2,5 mg etwa 18 Tage, für 10 mg etwa 46 Tage, d. h.

bei einer Steigerung der Dosis um das Vierfache steigt die Wirkungsdauer nur etwa um das Zweifache. Bei weiterer Dosenerhöhung bei gleicher Kristallgröße muß diese Relation der Dosis zur Wirkungsdauer noch ungünstiger werden, da bei gleicher Lebensdauer der gegebenen Kristalle eine immer geringer werdende Zunahme der Wirkungsdauer eintreten muß.

Die Ableitung der allgemeinen Beziehung zwischen Resorptionsgröße und Wirkungsfläche bei variierter Dosis wird dadurch erschwert, daß der Wirkungsanstieg eine gekrümmte Kurve darstellt und außerdem eine von der „Schwellendosis" abhängige Trägheit besitzt, so daß sie nicht ohne weiteres auf die Resorptionskurve bezogen werden kann. Man kann aber wohl angenähert dieses Verhalten beurteilen, wenn man auf Grund der abgeleiteten „Resorptionskurve" bis zur Erreichung des Maximums einen Mittelwert errechnet und diesen bei den verschiedenen Dosen in Beziehung setzt. Es ergibt sich dann, daß für die Erreichung einer bestimmten Kammgröße eine mittlere Schwellendosis vorhanden sein muß. Der in dem Wert mittlere Schwellendosis mal Zeit bis Wirkungsmaximum zum Ausdruck kommende Teil der Dosis muß dann für diesen Anteil der Wirkung verantwortlich sein. Bei Auswertung der vorliegenden Kurven scheint sich zu ergeben, daß für die schnellere Erreichung eines gleichen Wirkungsmaximums, ein höherer mittlerer Schwellenwert notwendig ist als für die langsamere Erreichung des gleichen Wertes.

Eine analoge Überlegung scheint für den abfallenden Teil der Wirkungsfläche zu gelten. Auch hier ist bei einem langsamen Abfall der Wirkungskurve, soweit man das auf Grund der vorliegenden Befunde überhaupt beurteilen kann, eine kleinere mittlere Schwellendosis für die Erhaltung einer relativ größeren Kammgröße ausreichend. Es läßt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht entscheiden, ob dieser Wirkungscharakter direkt von der Resorptionsgröße bestimmt wird oder ob noch andere Faktoren sich in Abhängigkeit von der Resorptionsart in verschiedener Weise auswirken.

Trotzdem kann ohne weiteres ersehen werden, daß eine optimale Wirkung hinsichtlich der Größe und Form der Wirkungsfläche dann vorhanden ist, wenn zwischen der Geschwindigkeit der Wachstumsreaktion und der Resorptionsgröße eine bestimmte Relation besteht. Diese Feststellung zeigt besonders, daß abhängig von derartigen Verhältnissen die Beurteilung der Wirkung an verschiedenen Objekten besonders für die Wirkungsdauer auf einem bestimmten Niveau mit einer individuellen Beziehung zwischen Dosis und Wirkung zu rechnen hat. Es ist sicher von Interesse, auch für andere Situationen diese Verhältnisse genauer abzuklären.

Die diskutierten Daten charakterisieren somit weitgehend die Relation zwischen der gegebenen Dosis und der Resorptionsgröße und der

erzielten Wirkung, soweit dies ohne Bestimmung der Konzentration der Steroide im Organismus möglich ist. Besonders eindeutig ist auch zu erkennen, in wie verschiedener Weise, Form und Größe der Wirkungsfläche durch die Änderung der Dosis oder durch Änderung der Resorptionsgröße beeinflußt wird. Sie zeigen weiter, welche Faktoren berücksichtigt werden müssen, um zu einer Beurteilung derartiger Beziehungen bei Stoffen mit unbekannten Wirkungseigenschaften zu kommen.

Auf Grund dieser Ergebnisse sollte nunmehr jede beliebige Wirkungsfläche bei bekannter Dosis hinsichtlich der untersuchten Faktoren bewertet werden können.

### *III. Wirkungsfläche verschiedener Ester.*

Um diese Folgerung zu beweisen ist es notwendig, an Hand der Kurven von beliebigen, verschiedenen Verbindungen zu zeigen, daß ihre Eigenschaften auf Grund der obigen Überlegungen erklärbar sind. Wir geben hierfür die Wirkungsdaten einer größeren Reihe von Kristallsuspensionen und Öllösungen. Es wurde die Wirkung von Testosteronpropionat, -isobutyrat, -n-valerianat in Kristallsuspension sowie jene des -propionats, des -isobutyrats, des -n-valerianats und -undecylenats in Öllösung verwandt. Bei ihrer Besprechung ziehen wir vor, nicht die Kristallsuspensionen und die Öllösungen getrennt, sondern die Daten insgesamt zu behandeln.

Die Ergebnisse werden so dargestellt, daß die Wirkung einer gleichen Dosis von 10 mg i. m. aller jener Verbindungen zusammengefaßt wird, die einer einheitlichen Deutung zugänglich sind. Hierzu werden die Verbindungen so geordnet, daß sie nach der Wirkung ohne Rücksicht auf die Art der Präparate zusammengestellt werden. Es ergibt sich, daß alle Werte für diese Verbindungen sich zwanglos so auffassen lassen, daß der einzige Unterschied, der zwischen ihnen besteht, durch die Resorptionsgröße bedingt ist. Vergleicht man die Wirkungsfläche mit den Werten, die mit der gleichen Dosis einer gleichen Verbindung (Abb. 1) bei verschiedener Kristallgröße erhalten wurden, so ergibt sich eine außerordentlich weitgehende formale Übereinstimmung (Abb. 5).

Die „schwach wirkenden" Verbindungen sind damit als solche mit zu rascher Resorption, die lang und stark wirkende im wesentlichen als solche mit langsamer Resorption anzusehen gegenüber der Hauptgruppe, die einen intermediären „optimalen" Typus darstellt. Diese Schlußfolgerung ist in voller Übereinstimmung mit den bisher gemachten Feststellungen. Es soll nur bemerkt werden, daß diese Rückführung auf den Faktor der Resorption nicht unbedingt sagt, daß *nur* die Resorption aus dem Injektionsdepot verantwortlich ist, sondern sie besagt nur, daß alle von dieser indirekt abhängigen und alle sonst vorhandenen Faktoren

sich in analoger Weise auswirken. Nur dann, wenn bei einer Substanz mit keiner Applikationsform das Optimum der Wirkung der besten Substanz der Gruppe erreicht wird, können neben der Resorption andere mitbestimmende Wirkungsunterschiede vorliegen.

Außer durch dieses Verhalten lassen sich diese Verbindungen durch die übrigen Wirkungsdaten — Wirkungsmaximum, Wirkungsdauer, Wirkungsfläche — charakterisieren. Das Wirkungsmaximum verhält sich gleichsinnig zur Wirkungsfläche im Kurventeil mit ansteigender Wirkungsfläche, dann bleibt dieser Wert konstant trotz zunehmender Fläche. Die Zeitdauer bis zur Erreichung des Wirkungsmaximums nimmt mit

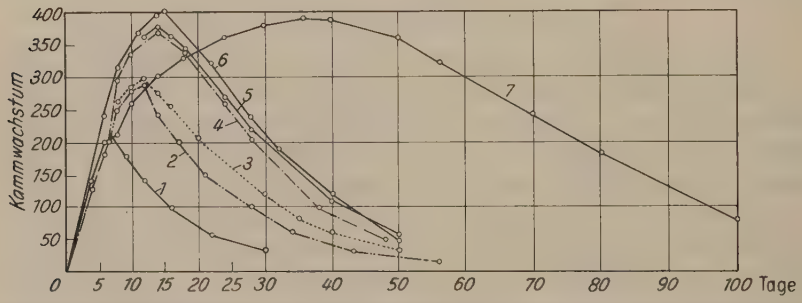



Abb. 5. Wirkungsfläche gleicher Dosen (einmalige Injektion von 10 mg i. m.) von verschiedenen Testosteronestern in verschiedenen Applikationsformen nach Wirkungsgröße angeordnet. 1. Testosteron-propionat in Öl, 2. Testosteron-propionat Kristalle (0,05—0,1 mm), 3. Testosteron-isobutyrat in Öl, 4. Testosteron-isobutyrat Kristalle (0,05—0,1 mm), 5. Testosteron-valerianat Kristalle (0,05—0,1 mm), 6. Testosteron-valerianat in Öl, 7. Testosteron-undecylenat in Öl.

dem Anstieg der Wirkungsfläche ebenfalls in einfacher Relation zu. Erst bei „stark verlangsamter" Resorption nimmt die Beziehung dieses Wertes zur Wirkungsfläche einen anderen Charakter an, anzeigend, daß jetzt die Zunahme der Dauer bis zur Erreichung des Maximums ebenso wie die Wirkungsdauer selbst einen neuen dominierenden Einfluß erhält. Dies gilt für die verschiedenen geprüften Dosen beim Vergleich unter sich. Das Verhalten der Wirkungsdauer bei den Verbindungen zeigt für einen Schwellenwert von 100% Kammwachstum in allen Fällen den relativ verringerten Zuwachs der Wirkungsdauer mit zunehmender Dosis, damit beweisend, daß auch für diese Verbindungen die Beziehung zwischen der Resorptionskurve und der Wirkungsdauer der zu erwartenden entspricht. Abb. 6.

Alle Daten verhalten sich somit weitgehend analog wie die gleichen Daten bei Änderung der Resorptionsform eines gleichen Stoffes. Es kann somit die Ursache des besonderen Wirkungsverhaltens auch für alle anderen Dosen dieser Verbindungen und beliebige andere Verbindungen beurteilt werden.

Neben den bisher besprochenen Verbindungen sind in folgender Abbildung diejenigen zusammengefaßt, die bei gleicher Dosis von 10 mg einen anderen Wirkungstypus ergeben.

Es handelt sich um Testosteron-phenylacetat, Testosteron-hexahydrobenzoat und freies Testosteron. Die dargestellten Kurven zeigen, daß sich die Wirkungsfläche nicht in die Kurve Abb. 5 einordnen läßt, es weichen sowohl Höhe, Dauer und Anstiegsgeschwindigkeit ab. Die Wirkung verhält sich somit, als ob eine kleinere Dosis gegeben worden wäre. Werden diese Kurven mit den Wirkungskurven verschiedener Dosen von Testosteron-n-valerianat zur Deckung gebracht, so treten diese Verhältnisse noch genauer in Erscheinung. Entsprechend der Flächenform und Größe verhalten sich auch die Koordinaten Dauer und Wirkungshöhe abweichend. Abb. 7.

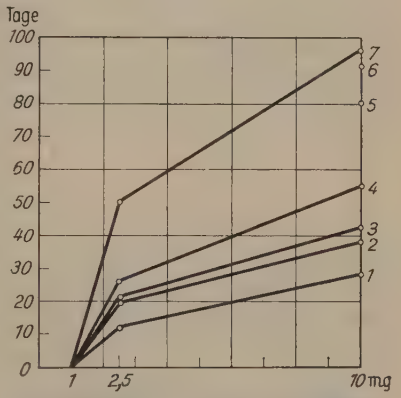



Abb. 6. Beziehungen zwischen Wirkungsdauer und Resorptionsgröße verschiedener Testosteronester bei einer Wirkungshöhe von 100% Kammwachstum und in verschiedenen Dosen. 1. Testosteron-propionat Kristalle (0,05 bis 0,1 mm) 2,5 u. 10 mg i. m., 2. Testosteron-isobutyrat Kristalle (0,05—0,1 mm) 2,5 u. 10 mg i. m., 3. Testosteron-n-valerianat in Öl 2,5 u. 10 mg i. m., 4. Testosteron-isobutyrat Kristalle (0,2 mm) 2,5 u. 10 mg i. m., 5. Testosteron-isobutyrat Kristalle (0,2—0,3 mm) 10 mg i.m., 6. Testosteron-isobutyrat Einzelkristalle 10 mg i. m., 7. Testosteron-undecylenat in Öl 2, 5 u. 10 mg i. m.

Da diese Verbindungen also hinsichtlich Form und Größe der Wirkungsfläche von dem typischen Verhalten „optimaler Ester" in Kristallsuspension verschiedener Größe abweichen, muß angenommen werden, daß das Resorptionsverhalten dieser Substanzen ein anderes ist, oder aber, daß noch andere Faktoren wie Verteilung, Abbau, Speicherung u. a. eine modifizierende Rolle spielen. Auch diese Frage könnte nur durch Bestimmung der Konzentration im Organismus endgültig abgeklärt werden. Es genügen aber die vorliegenden Befunde, um eindeutig zu zeigen, daß es gelingt, mit diesem indirekten Verfahren solche Verbindungen ausfindig zu machen, die mit Sicherheit einen ungünstigeren Wirkungscharakter besitzen als die bisher als optimal anzusprechenden.

Die Gesamtheit der vorliegenden Befunde erlaubt somit, den den Substanzen als solche innewohnenden Wirkungstypus zu charakterisieren, ihre Eignung für bestimmte Effekte zu beurteilen und ihre Wirkung unter Umständen durch Abwandlung von Applikationsform und Dosis an gegebene therapeutische Bedingungen anzupassen. Nur bei Kenntnis dieser Tatsachen kann ein optimaler Anwendungstyp für beliebige Verhältnisse entwickelt werden.

## Diskussion.

Es ist vielleicht zweckmäßig, mit einigen Worten zu erörtern, welche Folgerungen sich aus den Ergebnissen für andere Wirkungen ergeben. Es ist ohne weiteres klar, daß die Zusammenhänge zwischen Dosis und Wirkung bei ähnlichen Verbindungen wie Nebennierenrindenhormonen, Oestrogen usw. bestehen müssen, und daß damit die Anwendung der allgemeinen Regeln für die Beurteilung der Wirkung ohne weiteres möglich ist. Schwieriger liegen die Verhältnisse bei Stoffen, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften von den besprochenen abweichen, und bei Wirkungen, die andere Wirkungsmaße erfordern. Bei der Untersuchung von Sulfonamiden haben wir bereits früher[1] die Beziehung zwischen der Konzentrationszeitfläche in Abhängigkeit von der Resorption und als Grundlage der Wirkung dargelegt. Es zeigt sich bei diesen, um nur ein Beispiel zu nennen, daß eine 100%ige Heilwirkung bei gleicher Konzentrationszeitfläche in einem gewissen Bereich unabhängig davon zu erzielen ist, ob eine hohe Konzentration bei kurzer Zeit oder eine niedere Konzentration bei längerer Zeit die Fläche ergibt. Dieses Verhalten ist somit abweichend von der Wirkungsrelation bei den Testosteronestern.

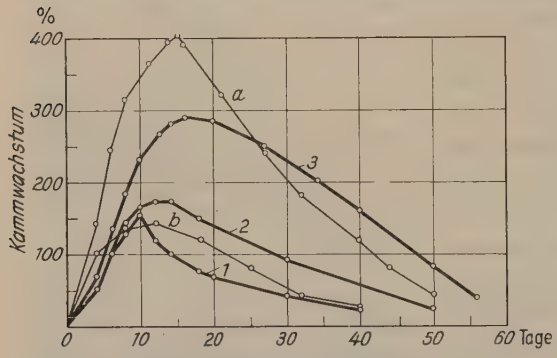



Abb. 7. Vergleich abweichender Wirkungsflächentypen mit jenen „normaler" Typen bei gleicher Dosis (einmalige Injektion von 10 mg i. m.) (Dicke Kurve) 1. Testosteron Kristalle (0,001—0,005 mm), 2. Testosteron-phenylacetat in Öl, 3. Testosteron-hexahydrobenzoat in Öl, verglichen mit Testosteron-n-valerianat in Öl 2,5 mg (b) und 10 mg (a) i. m. (Dünne Kurve).

Es besteht nur die Möglichkeit, die beiden Feststellungen miteinander in Zusammenhang zu bringen, wenn die 100%ige Heilwirkung dem Maximum des Kammwachstums entsprechen würde. Es scheint sich wohl aus den in dieser Arbeit mitgeteilten Befunden ergeben zu können, daß auch für das Maximum des Kammwachstums die aus resorbierter Menge und Dauer gebildete Fläche der für die Wirkung entscheidende Faktor ist. Ob diese beiden Wirkungsmaße wirklich völlig analog sind, kann auf Grund der heutigen Unterlagen nicht beurteilt werden und bedarf weiterer Abklärung. Immerhin ergibt sich aus diesem Vergleich, daß für die allgemeinere Auswertung derartiger Befunde die Art der Reaktion, das gewählte Wirkungsmaß und Besonderheiten von der Substanz als solcher innewohnenden Eigenschaften für die differenzierte Beurteilung des Resultats zu berücksichtigen sind. Es kann als wahrscheinlich angesehen

werden, daß es auch für andere Wirkungen aufschlußreich sein wird, mit Hilfe der hier angewandten indirekten Methode neben der Bestimmung der Organkonzentration Unterschiede dieser Faktoren zumindest in erster Annäherung zu ermitteln. Daß diesem allgemeine Bedeutung zukommt, ist ohne weiteres klar, wenn man berücksichtigt, daß die hauptsächlichste Methode für die Änderung der Wirkungsgröße die i.v.-, s.c.- und p.o.-Anwendung ist, ohne daß bei den für diese drei verschiedenen Applikationsarten bestehenden Unterschieden des Wirkungsverlaufes heute kaum für eine einzige Substanz beurteilt werden kann, ob ausschließlich die Resorptionsänderung oder auch andere Eigenschaften der Substanz für den verschiedenen Wirkungscharakter maßgebend sind. Die in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse können somit der Ausgangspunkt einer Bearbeitung dieser in allgemein pharmakologischer Hinsicht wichtigen Probleme sein.

## Zusammenfassung.

Es wird die Form und Größe der Zeit-Wirkungsfläche für die Wirkung von Testosteronestern auf das Wachstum des Kapaunenkammes bei variierter Dosengröße und gleicher Resorptionsform und bei verschiedener Resorptionsgröße, aber gleicher Dosis bestimmt.

Bei alleiniger Änderung der Resorptionsgröße mittels Suspensionen verschieden großer Kristalle steigen Wirkungsmaximnm und Wirkungsdauer zunächst gleichmäßig an, von einem der Dosis entsprechend erreichbaren Maximum an sinkt die Wirkungshöhe ab, während die Wirkungsdauer weiter zunimmt. Entsprechend dem verschiedenen Verhalten dieser beiden Faktoren ergibt sich die verschiedene Form und Größe der Wirkungsflächen. Dieses Verhalten kann darauf zurückgeführt werden, daß sowohl die täglich resorbierte Menge als auch die Dauer der Resorption wirksamer Schwellendosen bei den verschiedenen Präparaten geändert wird.

Bei variierter Dosis, aber gleicher Resorptionsart des verwandten Präparates ergibt sich eine von der vorstehenden abweichende Kurvenschar. Innerhalb des gewählten Dosenbereichs steigen Wirkungshöhe, Wirkungsdauer und Wirkungsfläche gleichartig an. Dieses Verhalten ist dadurch bedingt, daß bei variierter Dosis aber gleicher Lebensdauer der Kristalle nur die in der Zeiteinheit resorbierte Menge und die Form des Ablaufes der Resorptionskurve geändert wird.

Änderung der Resorptionsgröße oder der Dosis bedingen somit von einander verschiedene charakteristische Wirkungsänderungen.

Die allgemeinen Folgerungen für die Beurteilung pharmakologischer Wirkungen auf Grund der Beziehung zu Resorptionsgröße und Dosis werden erörtert.

## Literatur.

[1] Meier, R.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 695. — [2] Meier, R., u. P. Gasche: Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Fribourg 1945, p. 225. — [3] Meier, R., P. Gasche u. H. Frey: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 107. — [4] Meier, R, u. E. Tschopp: Acta Endocrinol. **17**, 278—289 (1954). — [5] Meier, R., u. E. Tschopp: Acta Endocrinol. **19**, 11—20 (1955). — [6] Miescher, K., H. Kägi, C. Scholz, A. Wettstein u. E. Tschopp: Biochem. Z. **294**, 39 (1937). — [7] Miescher, K., A. Wettstein u. E. Tschopp: Biochem. J. (brit.) **30**, 1977 (1936). — [8] Miescher, K., A. Wettstein u. E. Tschopp: Schweiz. med. Wschr. **1936**, 763. — [9] Tschopp, E.: Schweiz. med. Wschr. **1950**, 673. — [10] Tschopp, E., u. R. Meier: Schweiz.med. Wschr. **1952**, 593. — [11] Tschopp, E., u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1954**, 1392.

Professor Dr. Rolf Meier, Wissenschaftl. Laboratorien d. Ciba Aktiengesellschaft, Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 547—550 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung und Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen, zur Zeit Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut (Direktor: Prof. Dr. F. Hildebrandt).

# Über die Gefäßwirksamkeit wasserlöslicher Crataegussäuren.

Ergänzende Mitteilung zu der Arbeit von Dörner u. Kuschke: Zur Frage einer pharmakodynamischen Wirkung der aus Crataegus gewonnenen Triterpensäuren (Crataegussäuren).

Von

H. J. Kuschke und H. Straub.

*(Eingegangen am 26. Juli 1955.)*

Nach Dörner u. Kuschke besitzen die nicht wasserlöslichen Crataegussäuren keine direkt coronargefäßerweiternde Wirkung. Vielmehr zeigte sich in ihren Versuchen, daß im Vordergrund der Wirkung bei intravenöser Injektion eine Schädigung der Lungen mit Hypoxie und Atmungssteigerung stand, welche ihrerseits zu einer Mehrdurchblutung in den Coronargefäßen führen konnte. Die gewebsschädigende Wirkung wurde sowohl auf den als Lösungsmittel benutzten 96%igen Alkohol als auch auf die im Blut wieder ausfallenden Crataegussäuren zurückgeführt.

Nachdem das in diesen Versuchen verwendete Triterpensäurengemisch und sein Einzelbestandteil Ursolsäure uns nunmehr in wäßriger kolloider Lösung zur Verfügung standen, interessierte die Frage, ob diesen in der Blutbahn in Lösung bleibenden Substanzen eine echte Gefäßwirksamkeit zukommt[1].

## Methodik.

Durchblutungsmessung an der Arteria coronaria dextra von 5 Hunden mit der Thermostromuhr. Narkose: 50 mg/kg Pernocton i.m., im Laufe eines Versuches 2—3mal Nachinjektion von 200 mg/Tier. Künstliche Atmung. Registrierung des arteriellen Blutdruckes in einer Art. femoralis photoelektrisch nach Rein. Injektion des Triterpensäuregemisches (Sol $C_{33}$) und der Ursolsäure (Sol 112—114) in 1%iger Lösung in wechselnder Reihenfolge intravenös oder in eine Pulmonalvene wie bei Dörner u. Kuschke. Dosierung 1,0 und 2,0 mg/kg. Kontroll-Injektionen mit physiol. NaCl-Lösung. Um einen Anhalt über die vasodilatatorische Reaktionsfähigkeit des Tieres zu gewinnen, wurden in 4 Versuchen vergleichsweise 0,5 bzw. 1,0 mg/kg Papaverin-HCl intravenös injiziert.

## Ergebnisse.

Bei intravenöser Injektion trat nach dem Crataegussäurengemisch unter 5 Reaktionen einmal eine leichte Mehrdurchblutung auf (Tab. 1). Nach Ursolsäure kam es bei 7 Reaktionen in keinem Fall zu einer Durchblutungssteigerung (Tab. 2). Durch vergleichsweise injiziertes Papaverin

[1] Wir danken der Fa. Byk Gulden, Konstanz, für die Überlassung der Versuchsmengen.

war dagegen stets eine deutliche Mehrdurchblutung zu erzielen (Tab. 2). Injektion in eine Pulmonalvene führte in 2 von 4 Versuchen sowohl bei dem Crataegussäurengemisch (Tab. 1) als auch bei der Ursolsäure (Tab. 2) zu leichten Durchblutungssteigerungen, deren Maximalwerte zwischen +7 und +18% lagen. Eine dieser positiven Reaktionen (Tab. 2, V 1)

Tabelle 1. *Blutdruck- und Durchblutungsänderungen in der Art. coronaria dextra beim Hund nach Injektion eines Crataegussäuregemisches i.v. bzw. in eine Vena pulmonalis. 9 Reaktionen aus 5 Versuchen.*

| Versuch u. Reaktion Nr. | Dosis | Blutdruck | | Durchbl.-Änderung Art. coron. d. | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ausgangswert | Änderung | maximal % | Dauer | |
| I 2 | 1,0 mg/kg i.v. | 157/132 | — | — | — | |
| II 5 | 2,0 mg/kg i.v. | 158/110 | — | — | — | |
| III 2 | 2,0 mg/kg i.v. | | | +10% | 4 min | |
| IV 3 | 2,0 mg/kg i.v. | 138/68 | — | — | — | |
| V 5 | 2,0 mg/kg i.v. | 125/102 | 137/112 nach 90 sec 133/107 nach 150 sec | +6% | 2,5 min | druckpassiv |
| II 6 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 150/115 | 146/112 nach 30 sec | +9% | > 3 min | nur 3 min registriert |
| III 3 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 118/78 | — | — | — | |
| IV 1 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 136/58 | — | — | — | |
| V 5 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 118/92 | — | +18% | 6 min | |

war jedoch teilweise druckpassiv bedingt; außerdem führte hier die Kontrollinjektion mit physiol. NaCl-Lösung ebenfalls zu einer leichten Mehrdurchblutung von +9%, so daß diese Durchblutungssteigerung nicht auf eine echte Gefäßwirksamkeit der injizierten Ursolsäure zu beziehen ist. Bei der anschließend wiederholten Injektion bewirkte die Substanz eine Blutdrucksenkung mit Minderdurchblutung.

Die beiden Stoffe führten somit bei intrapulmonaler Injektion unter insgesamt 9 Reaktionen dreimal zu einer Mehrdurchblutung in den

Tabelle 2. *Blutdruck- und Durchblutungsänderungen in der Art. coronaria dextra beim Hund nach Injektion von Ursolsäure i.v. bzw. in eine Vena pulmonalis- 12 Reaktionen aus 5 Versuchen. Vergleichsweise i.v. Injektion von Papaverin-HCl in 4 Versuchen.*

| Versuch u. Reaktion Nr. | Dosis | Blutdruck | | Durchbl.-Änderung Art. coron. d. | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ausgangswert | Änderung | maximal % | Dauer | |
| I 1 | 1,0 mg/kg i.v. | 168/112 | 154/105 nach 4 min | Minderdurchbl.[1] | > 6 min | [1] nur qualitativ auswertb. |
| II 1 | 1,0 mg/kg i.v. | 144/93 | — | — | — | Mehrdurchbl. n. 0,5 mg/kg Papaverin i.v. max + 37%, Dauer 35 min |
| II 4 | 2,0 mg/kg i.v. | 129/98 | — | — | — | |
| III 1 | 2,0 mg/kg i.v. | 125/75 | — | −6% | > 10 min | Mehrdurchbl. n. 0,5 mg/kg Papaverin i.v. max + 16%, Dauer 5 min |
| IV 6 | 2,0 mg/kg i.v. | 125/59 | — | — | — | Mehrdurchbl. n. 0,5 mg/kg Papaverin i.v. max + 16%, Dauer 5 min |
| V 4 | 2,0 mg/kg i.v. | 135/107 | — | — | — | Mehrdurchbl. n. 1,0 mg/kg max + 80%, Dauer 50 min |
| V 7 | 2,0 mg/kg i.v. | 120/88 | — | — | — | Spont. Druck- u. Durchbl.-Schwankg. |
| II 2 | 1,0 mg/kg i. V. pulmon. | 143/99 | — | + 11% | > 3 min | nur 3 min registriert |
| III 5 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 113/78 | — | — | — | |
| IV 4 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 130/60 | — | — | — | |
| V 1 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 127/94 | 130/100 nach 4 min 123/96 nach 8 min | + 18% | > 8 min | n. Kontroll-Injektion mit physiolog. NaCl-Lösg., Mehrdurchbl. (+ 9%) |
| V 3 | 2,0 mg/kg i. V. pulmon. | 129/114 | 96/81 nach 15 sec 120/105 nach 1 min 124/109 nach 4 min | −10%[1] | > 10 min | [1] druckpassiv |

Coronargefäßen. Diese positiven Resultate waren bei den beiden Tieren zu verzeichnen, welche die stärksten Papaverinreaktionen zeigten. Sie sind, verglichen mit deren Ausmaß bei geringerer Dosierung und intravenöser Applikation, so schwach, daß ihnen keine Bedeutung zugemessen werden kann.

Eine capillarschädigende Wirkung in den Lungen mit Atmungssteigerung bei intravenöser Injektion, die Dörner u. Kuschke mit den nicht wasserlöslichen Crataegussäuren fast regelmäßig beobachtet hatten, trat in unseren Versuchen nicht auf. Diese Tatsache sowie das Fehlen einer Durchblutungssteigerung bei intravenöser Injektion bestätigt die von den Autoren aus ihren Befunden gezogene Folgerung, daß die bei intravenöser Injektion erzielten Mehrdurchblutungen als Folge der Lungenschädigung aufzufassen waren.

## Zusammenfassung.

Bei der Prüfung eines wasserlöslichen Crataegussäurengemisches und einer wasserlöslichen Ursolsäure auf ihre etwaige coronargefäßerweiternde Wirkung ergab sich:

1. bei intravenöser Injektion beider Substanzen keine Gefäßwirksamkeit;

2. bei Injektion in eine Pulmonalvene eine schwache durchblutungssteigernde Wirkung in 3 von 9 Reaktionen;

3. keine lungenschädigende und atmungssteigernde Wirkung der Stoffe.

## Literatur.

Dörner, J., u. H. J. Kuschke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 24—43 (1955) u. **225**, 144—147 (1955) Verhandl. Ber.

Dr. H. J. Kuschke u. Dr. H. Straub, Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 226, S. 551—557 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor Professor Dr. Dr. W. Schulemann).

# Zur analgetischen und analgesieverstärkenden Wirkung von Chlorpromazin (Megaphen).

Von
Hans Friebel und Claus Reichle.

*(Eingegangen am 28. Juli 1955.)*

Nach Ansicht von Lembeck haben Phenothiazinderivate, insbesondere (N-[3′-Dimethylaminopropyl]-3-chlorphenothiazinhydrochlorid)[1], keine analgetische Wirkung, wie wir sie von Morphin oder Amidopyrin kennen. Neuere klinische Beobachtungen (Zeh) lassen aber vermuten, daß Megaphen — im Gegensatz zu bisherigen Vorstellungen — nicht nur die Wirkung der Analgetica verstärkt, sondern auch direkt analgetisch wirken kann. Im folgenden wird daher versucht, die Wirkung von Megaphen auf den Schmerz im Tierexperiment eingehender zu analysieren.

Die Versuche wurden an etwa 2000 Mäusen durchgeführt. Analgesie wurde mittels Wärmeschmerz und faradischer Reizung nachgewiesen.

Wärmeschmerzerzeugung in Anlehnung an die Methode von Hardy, Wolff u. Goodell mit einem auf den Schwanz gerichteten Brennstrahl. Abstoppen des Zeitintervalls vom Beginn der Einwirkung bis zur Zuckung des Schwanzes. Die Reizstärke wurde so gewählt, daß der Schmerzreflex nach 3—4 sec erfolgte. Gruppen von je 10 Mäusen wurden vor der Injektion der Prüfsubstanzen 3mal im Abstand von je 5 min überprüft, ob sie innerhalb dieses Zeitintervalls reagieren. Anschließend s.c. Injektion und weiteres Verfolgen der Reaktionsgeschwindigkeit im Abstand von 10 min, 60 min lang. Bei jeder Maus wurde der Mittelwert aus den 20, 40 und 60 min nach der Injektion gemessenen Reaktionszeiten mit dem Mittelwert der vorher bestimmten Normalwerte verglichen. Verlängerungen um mehr als 50% wurden als Analgesie gewertet. Dauer der Bestrahlung nicht über 10 sec, um Verbrennungen zu vermeiden. Prüfung jeder Arzneimitteldosis an 40 Tieren.

Schmerzreflexe durch faradischen Strom wurden mit dem Medeor-Reizgenerator, Impulsfrequenz 1/sec, Impulsdauer 15 msec, Impulsstärke 0,6 bzw. 0,9 mA, ebenfalls am Schwanz erzeugt. Als Elektroden dienten grammophonnadelähnliche V2A-Stahlspitzen, in einem Plexiglasdeckel im Abstand von 25 mm gefedert angebracht; sie paßten sich der Dicke verschieden starker Schwänze elastisch an und drückten sich dabei leicht in ihre obersten Hornschichten ein.

Die hypnotische Wirkung von Evipan und Luminal, gemessen am Verlust der Stellreflexe, wurde nach Zipf u. Alstaedter bestimmt. Beobachtungszeit der auf schiefe Ebenen gesetzten Tiere 60 min vom Beginn der s.c. Injektion an. Berechnung der ED in jedem Falle nach Litchfield u. Wilcoxon.

[1] Megaphen, Largactil bzw. RP 4560.

### 1. Analgesieprüfung.

In der Tab. 1 sind die ED 25 und 50 von Morphium, Pyramidon und Megaphen angegeben:

Tabelle 1. *Vergleich der zur Analgesie erforderlichen Arzneimitteldosen bei der Schmerzerzeugung durch Wärme oder faradischen Strom.*

| Präparat | Wärmereizung | | Faradische Reizung | |
|---|---|---|---|---|
| | ED 50 mg/kg | ED 25 mg/kg | ED 50 mg/kg | ED 25 mg/kg |
| Morphium . . | 2,1 (1,53—2,73) | 1,1 | 5,0 (4,1—6,0) | 3,4 |
| Pyramidon . | 95,0 (66,4—135,7) | 46,0 | 200,0[1] (188,6—212,0) | 150,0 |
| Megaphen . . | Keine dosisabhängige Verlängerung der Reaktionszeit | | 6,4 (5,41—7,55) | 3,7 |

[1] Die ED 50 für Pyramidon konnte bei faradischer Reizung lediglich rechnerisch bestimmt werden, da 200 mg/kg Vergiftungserscheinungen hervorrufen.

Eine Hemmung der Schmerzreaktion durch Megaphen war nachweisbar, jedoch nur bei faradisch gereizten Tieren. Morphium und Pyramidon reduzierten die Reaktion auf beide Reizarten. Der faradisch erzeugte Schmerz erforderte jeweils größere Arzneimitteldosen als der Wärmeschmerz.

Aus der Tab. 2 geht das verschiedene Verhalten megaphenbehandelter Tiere bei Wärmereizung einerseits und elektrischer Reizung andererseits im einzelnen hervor:

Tabelle 2. *Unterschiedliches Verhalten megaphenbehandelter Mäuse bei Wärme- und faradischer Reizung. Nur bei faradischer Reizung steigt die Zahl der nichtreagierenden Tiere dosisabhängig an.*

| | Dosis mg/kg | Wärmereizung Analgetische Tiere in % | Faradische Reizung Analgetische Tiere in % |
|---|---|---|---|
| Megaphen . . . . . | 1,25 | | 2 |
| | 2,5 | | 13 |
| | 5,0 | 0 | 37 |
| | 7,5 | 10 | 58 |
| | 10,0 | 6,3 | 55 |
| | 15,0 | 28 | 86 |
| | 20,0 | 21 | |

In weiteren Versuchen wurde geprüft, wie sich der Schmerzreflex bei megaphenbehandelten Tieren verhält, denen gleichzeitig Morphium oder Pyramidon verabreicht wird. Megaphen wurde mit Morphium oder Pyramidon in der Spritze gemischt verabreicht. Die Mischungsverhältnisse und Ergebnisse sind in der Tab. 3 angegeben:

Tabelle 3. *Nachweis der analgesieverstärkenden Wirkung von Megaphen.*

| Prüfsubstanz | Wärmereizung | | | Faradische Reizung | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dosierung in mg/kg | analgetische Tiere in % | Verstärkung der analget. Wirkung durch Megaphen stat. gesichert | Dosierung in mg/kg | analgetische Tiere in % | Verstärkung der analget. Wirkung durch Megaphen stat. gesichert |
| Morphium ($ED_{50}$) + Megaphen | 2,1<br>5,0 | 29 | nein | 5,0<br>5,0 | 90 | ja ($3\,\sigma$) |
| Morphium ($ED_{25}$) + Megaphen | 1,1<br>2,5 | 9 | nein | 3,4<br>2,5 | 66 | ja ($2\,\sigma$) |
| Morphium ($ED_{25}$) + Megaphen | 1,1<br>5,0 | 22 | nein | 3,4<br>5,0 | 73 | ja ($3\,\sigma$) |
| Morphium ($ED_{25}$) + Megaphen | 1,1<br>10,0 | 19 | nein | 3,4<br>10,0 | 80 | ja ($3\,\sigma$) |
| Pyramidon ($ED_{50}$) + Megaphen | 95,0<br>5,0 | 31 | nein | | | |
| Pyramidon ($ED_{25}$) + Megaphen | 46,0<br>2,5 | 8 | nein | 150,0<br>2,5 | 74 | ja ($3\,\sigma$) |
| Pyramidon ($ED_{25}$) + Megaphen | 46,0<br>5,0 | 17 | nein | 150,0<br>5,0 | 49 | ja ($2\,\sigma$) |
| Pyramidon ($ED_{25}$) + Megaphen | 46,0<br>10,0 | 19 | nein | 150,0<br>10,0 | 60 | ja ($3\,\sigma$) |

Der Nachweis der analgesieverstärkenden Wirkung von Megaphen gelang nur bei Anwendung von faradischem Strom. Die Wirkungssteigerung ist statistisch gesichert. Bei Wärmereizung wurde keine wesentliche Veränderung der analgetischen Wirkung von Morphium oder Pyramidon beobachtet. Die Hemmung des Schmerzreflexes war eher herabgesetzt. Wurde Megaphen 30 min vor Morphium injiziert, so kam es zu denselben Ergebnissen wie bei gleichzeitiger Gabe.

**2. Beziehungen zwischen analgetischer und temperatursenkender Wirkung.**

Analgetisch wirkende oder analgesieverstärkende Dosen von Megaphen hatten eine Senkung der Körpertemperatur zur Folge, wenn die Tiere in ihren Plexiglasröhren bei einer Raumtemperatur von 22° C verwahrt wurden. Nach 5 mg/kg fiel sie innerhalb von 60 min um $4{,}16° \pm 2{,}20°$. Zusätzliche Gaben von 1,1, 2,1, 3,4 oder 5 mg/kg Morphium bewirkten innerhalb dieses Zeitraums keine stärkere Temperatursenkung.

Es wurde geprüft, ob die Wirkung der Analgetica auf den Schmerzreflex durch die Auskühlung beeinflußt wird. Die Analgesieprüfung wurde daher vergleichsweise bei 30° C Raumtemperatur durchgeführt. Unter

diesen Bedingungen kam es nach 1,1 mg/kg Morphium + 6,4 mg/kg Megaphen zu einem Anstieg der Körpertemperatur um 1,61° ± 1,42°, nach 3,4 mg/kg Morphium + 6,4 mg/kg Megaphen um 3,25° ± 1,54°. Morphium allein hatte keinen Einfluß auf die Temperatur. Ergebnisse der Analgesieprüfung bei 22° und 30° in Tab. 4:

Tabelle 4. *Einfluß der Raumtemperatur auf die schmerzhemmende Wirkung.*

| Prüfsubstanz | Raumtemperatur | Dosis mg/kg | analgetische Tiere in % | Verstärkung der analget. Wirkung durch Megaphen stat. gesichert | Dosis mg/kg | analgetische Tiere in % | Verstärkung der analget. Wirkung durch Megaphen stat. gesichert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Morphium $ED_{25}$ . . . . . | 22° C | 1,1 | 17,5 | | 3,4 | 37 | |
| Morphium $ED_{25}$ . . . . . | 30° C | 1,1 | 24,7 | | 3,4 | 56 | |
| Morphium $ED_{25}$ + Megaphen . . . . . | 22° C | 1,1<br>6,4 | 23 | nein | 3,4<br>6,4 | 75 | ja ($3\sigma$) |
| Morphium $ED_{25}$ + Megaphen . . . . . | 30° C | 1,1<br>6,4 | 14 | nein | 3,4<br>6,4 | 90 | ja ($3\sigma$) |

Die analgesieverstärkende Wirkung von Megaphen zeigte sich auch hier lediglich bei faradischer Reizung. Verhindern der Auskühlung hatte keine Abschwächung, eher eine Verstärkung der Schmerzhemmung zur Folge. Eine Verstärkung der Schmerzhemmung zeigte sich aber auch nach ausschließlicher Behandlung mit Morphium. Beziehungen zwischen der analgetischen und der temperatursenkenden Wirkung von Megaphen ließen sich demnach nicht erkennen.

### 3. Beziehungen zwischen analgetischer und sedativer Wirkung.

Megaphen übt im Dosisbereich von 5—10 mg/kg eine deutliche sedative Wirkung aus. Ihr Einfluß auf den Schmerzreflex wurde ebenfalls studiert. Da Megaphen wegen seiner analgetischen Wirkung nicht als Sedativum verwandt werden konnte, wurden ersatzweise die Hypnotica Evipan und Luminal, welche keine analgetische Wirkung haben, herangezogen und zusammen mit Morphium in Dosen verabreicht, die bei 50% der Behandelten zum Verlust der Stellreflexe (Herabfallen von der schiefen Ebene) führten. Ergebnisse in Tab. 5:

Die analgetische Wirkung von Morphium wurde durch die Hypnotica nicht verstärkt, sondern eher abgeschwächt. Dieser Effekt trat deutlicher nach Luminal als nach Evipan auf. Wurde Evipan 30 min vor Morphium verabreicht, so kam es zu einer stärkeren Hemmung der analgetischen Wirkung von Morphium als bei gleichzeitiger Gabe.

Tabelle 5. *Nachweis der analgesieabschwächenden Wirkung durch Sedativa.*

| Prüfsubstanz | Injekt.-Modus | Wärmereizung: Dosis mg/kg | Wärmereizung: analgetische Tiere in % | Wärmereizung: Abschwächung der analget. Wirkung durch Sedativa stat. gesichert | Faradische Reizung: Dosis mg/kg | Faradische Reizung: analgetische Tiere in % | Faradische Reizung: Abschwächung der analget. Wirkung durch Sedativa stat. gesichert |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Morphium $ED_{50}$ — Evipan $ED_{50}$ | s.c., gleichzeitig | 2,1<br>50,0 | 33 | nein | 5,0<br>50,0 | 40 | nein |
| Morphium $ED_{25}$ + Evipan $ED_{50}$ | s.c., gleichzeitig | 1,1<br>50,0 | 16 | nein | 3,4<br>50,0 | 36 | nein |
| Morphium $ED_{25}$ + Evipan $ED_{50}$ | s.c., Ev. 30 min vor Mo. | 1,1<br>50,0 | 2 | nein | 3,4<br>50,0 | 10 | ja ($2\sigma$) |
| Morphium $ED_{50}$ + Luminal $ED_{50}$ | s.c., gleichzeitig | 2,1<br>90,0 | 9 | ja ($3\sigma$) | 5,0<br>90,0 | 16 | ja ($3\sigma$) |
| Morphium $ED_{25}$ + Luminal $ED_{50}$ | s.c., gleichzeitig | 1,1<br>90,0 | 5 | nein | 3,4<br>90,0 | 12 | ja ($2\sigma$) |

## Diskussion.

Die Versuche zeigen, daß Megaphen bei der Maus analgetisch wirkt. Der Nachweis gelang bei Verwendung der elektrischen Reizmethode, jedoch nicht des Wärmereiztestverfahrens. Demgegenüber läßt sich die analgetische Wirkung von Morphium und Pyramidon sowie zahlreichen weiteren Analgetica mit beiden Methoden demonstrieren. Die Megaphenanalgesie ist daher nicht völlig identisch mit der Schmerzhemmung durch typische Analgetica.

Das unterschiedliche Verhalten läßt auf verschiedenartige Angriffspunkte in der Schmerzbahn schließen, zumal die Bahnen, über die der Schmerzreflex verläuft, bei beiden Reizarten nicht in allen Teilen übereinstimmen.

Irwin u. Mitarb. haben an Ratten mit durchschnittenem Rückenmark gezeigt, daß beim Wärmeschmerz die Umschaltung vom afferenten auf den efferenten Schenkel der Reflexbahn schon im Rückenmark in der Höhe von Th 4 bis Th 12 erfolgen kann. Von wesentlicher Bedeutung für die Höhe, in der die Überleitung auf den efferenten Schenkel erfolgt, scheint das Zeitintervall zu sein, das vom Bestrahlungsbeginn bis zur Erregung der Schmerzreceptoren vergeht. Je kürzer dieser Zeitraum ist, um so umschriebener ist nach v. Graevenitz das Areal, das effektorisch erregt wird, um so geringer ist wohl auch die Beteiligung zentral gelegener Teile des Nervensystems. Sie dürfte bei den hier beschriebenen Versuchen mit einer Reaktionszeit von 3—4 sec geringer gewesen sein als bei früheren Versuchen (Friebel u. a.) mit Reaktionszeiten von 5—7 sec infolge schwächerer Bestrahlung. Während bei den früheren Versuchen keine analgetische, aber doch die analgesieverstärkende Wirkung von Megaphen nachweisbar war, fehlte bei den jetzigen auch der analgesieverstärkende Effekt.

Bei der faradischen Reizung findet die Umschaltung auf den effektorischen Schenkel im Großhirn statt, die Tiere piepsen im Takt der Einzelreize. Wenn Megaphen unter diesen Versuchsbedingungen sowohl analgetisch als auch analgesieverstärkend wirkt, entfaltet es seine Wirkung offenbar vorwiegend im zentral gelegenen Anteil der Schmerzbahn, vielleicht in der Formatio reticularis, die Das u. Mitarb. für den speziellen Angriffspunkt halten und die nach Ansicht von Landois-Rosemann zugleich Bestandteil der Schmerzbahn ist. Morphin und Pyramidon dürften demgegenüber auch die peripher gelegenen Abschnitte stark beeinflussen.

Miller u. Elliott fanden bei Ratten, daß radioaktives Morphin ($C_{14}$) innerhalb des Zentralnervensystems im Rückenmark am stärksten massiert auftritt. Herr u. a. konnten an Spinal-Ratten den Wärmeschmerzreflex mit Morphin hemmen. Zu gleichen Ergebnissen kommen auch Bonnycastle u. a.

Wir halten die Dämpfung des faradisch erzeugten Schmerzreflexes durch Megaphen für eine spezifisch analgetische Wirkung. Sie steht nicht im Zusammenhang mit seinem Einfluß auf die Homoiothermie, sie beruht auch nicht auf sedativen Eigenschaften. Ihre Besonderheiten zeigen sich in seiner Affinität zu einem Substrat, das mit dem der Morphiumanalgesie nicht völlig identisch ist, und weiterhin in seinen therapeutischen Eigenschaften. Nach Zeh ist es bei speziellen Schmerzformen, z. B. dem *vegetativen* Schmerz (Trigeminusneuralgie) besonders wirksam.

Außerhalb der engeren Fragestellung wurde beobachtet, daß die analgetische Wirkung von Morphium einerseits durch gleichzeitige Evipan- oder Luminalgaben abgeschwächt wird, daß sie andererseits durch Erhöhung der Körpertemperatur gefördert wird. Diese Befunde lassen sich Vorstellungen zuordnen, die Starkenstein vom Wirkungsmechanismus der Analgetica entwickelt hat. Er nimmt an, daß Analgetica den Schmerzreflex nicht direkt hemmen, sondern einen physiologischen Mechanismus zur Zügelung der Schmerzreflexe erregend verstärken. Erhöhung der Körpertemperatur mag eine Verstärkung, sedativer Effekt eine Dämpfung der zur Analgesie führenden Hemmungserregung bewirken; doch kann wohl noch nicht klar übersehen werden, in welchem Umfang diese Vorstellungen zutreffend sind.

Vergleichende Untersuchungen von Analgetica mit zwei Reizmethoden sind schon vor uns von Kraushaar durchgeführt worden. Er glaubt, daß sie einen Einblick in den Wirkungsmechanismus der Analgetica ermöglichen. Unsere Befunde unterstützen seine Ansicht.

## Zusammenfassung.

Die Schmerzreaktion faradisch gereizter Mäuse wird durch Megaphen gehemmt (ED 50 = 5,0 mg/kg); bei Wärmereizung zeigt sich keine analgetische Wirkung. Die Verstärkung der Morphium- und Pyramidon-

analgesie durch Megaphen läßt sich ebenfalls mit der faradischen Reizmethode nachweisen. Wärmereizung, die zu Schmerzreflexen mit kurzen Reaktionszeiten (3—4 sec bei unbehandelten Tieren) führt, eignet sich zum Nachweis der analgesieverstärkenden Wirkung nicht. Die analgetische Wirkung von Megaphen steht nicht in Zusammenhang mit seinem Einfluß auf die Homoiothermie, sie ist unabhängig vom sedativen Effekt.

Mit beiden Testmethoden wurde gefunden, daß die analgetische Wirkung von Morphium durch gleichzeitige Evipan- oder Luminalgaben abgeschwächt wird; Erhöhung der Körpertemperatur fördert die Morphiumanalgesie.

Frl. Christel Doll danken wir für die wertvolle Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Untersuchungen.

## Literatur.

Bonnycastle, D. D., L. Cook u. J. Ipsen: Acta pharmacol. toxicol. **9**, 332 (1953). — Das, N. N., S. R. Dasgupta u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 248 (1955). — Friebel, H., H. Flick u. C. Reichle: Arzneimittel-Forsch. **4**, 171 (1954). — Graevenitz, A. v.: Diss. Bonn 1955. — Hardy, D. J., H. G. Wolff and H. Goodell: Pain, Sensations and Reactions. Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1952. — Herr, F., M. Nyiri u. J. Venulet: Acta physiol. Acad. Scient. Hungar. III, Fasc. I, S. 199 (1952). — Irwin, S., R. W. Houde, D. R. Bennett, L. C. Hendershot and M. H. Seevers: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 132 (1951). — Kraushaar, A.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 247 (1953). — Landois-Rosemann, H.: Physiologie des Menschen. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1950. — Lembeck, F.: Künstlicher Winterschlaf. Wien: Urban & Schwarzenberg 1955. — Litchfield, J. T. jr., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Miller, J. W., and H. W. Elliott: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 283 (1955). — Starkenstein, E.: Lehrbuch der Pharmakologie, Toxikologie und Arzneiverordnung. Leipzig-Wien: Franz & Deuticke 1938. — Zeh, W.: Dtsch. med. Wschr. **1955**, 689. — Zipf, H. F., u. R. Alstaedter: Arzneimittel-Forsch. **4**, 14 (1954).

Doz. Dr. H. Friebel, Pharmakol. Institut der Universität Bonn, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 558—562 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Professor Dr. Dr. W. Schulemann).

# Zur Hemmung des Hustenreflexes durch zentral angreifende Arzneimittel.

II. Mitteilung.

Von
C. Reichle und H. Friebel.

*(Eingegangen am 28. Juli 1955.)*

In einer früheren Arbeit haben wir an Meerschweinchen gezeigt, daß entgegen einer verbreiteten Ansicht (Schaumann) eine Parallelität zwischen schmerz- und hustenhemmenden Wirkungen morphinähnlicher Analgetica nicht besteht. Unbeantwortet blieb, ob nur Meerschweinchen diese Parallelität vermissen lassen oder ob auch bei anderen Tierarten keine so engen Beziehungen zwischen beiden Wirkungen bestehen. Die Untersuchungen wurden daher auf Ratten ausgedehnt.

Die Prüfung der hustenhemmenden Wirkung entsprach in fast allen Einzelheiten dem früher von Friebel, Reichle u. v. Graevenitz beschriebenen Verfahren. Lediglich die Konzentration von $SO_2$ im $SO_2$-Luftgemisch (hier 18,2 $cm^3$/min) und der Versuchsraum wurden abgeändert. Zu- und Ableitung des Gas-Luftgemisches in einen Glaskäfig ($23 \times 13 \times 13$ cm) mit Metallrahmen durch die Deckplatte, die auch das Mikrophon trägt. Öffnung des Versuchsraumes durch Abnehmen einer Seitenwand. Als Versuchstiere wurden weiße weibliche Ratten im Gewicht von 120—200 g verwandt. Die Arbeitsweise entsprach völlig den früheren Angaben. Im Vorversuch Auswahl von Tieren mit ausreichender Hustenbereitschaft, 30 min später s.c. Injektion der Prüfsubstanz, weitere 30 min später erneute 2 min dauernde Exposition. Die Tiere verhielten sich im gasdurchströmten Versuchsraum ähnlich wie Meerschweinchen, sie niesten aber häufiger und die Hustenstöße waren nicht ganz so kräftig und daher schwerer zu hören. Husten und Niesen ließen sich aber bei ständigem Beobachten sicher unterscheiden. Wie Meerschweinchen zeigten auch die Ratten jahreszeitlich bedingte Veränderungen der Hustenbereitschaft und Arzneiempfindlichkeit, darüber hinaus beeinflußten auch Alter und Gewicht die Testergebnisse. Witterungseinflüsse machten sich aber weniger störend bemerkbar als bei Meerschweinchen, ein Arbeiten während der Wintermonate war möglich. Die übrigen Faktoren wurden durch Auswahl geeigneter Tiere und Auswechseln der Serien nach 3monatiger Verwendung auf ein vertretbares Maß reduziert.

Die Prüfung der schmerzstillenden Wirkung wurde mit Hilfe der „twitch"-Reaktion am rasierten Rücken durchgeführt. Auch hier Auswahl geeigneter Tiere vor dem Versuch, Reizung mit dem Wärmestrahl und Arzneimittelapplikation wie bei Meerschweinchen. Während des Versuchs wurden die Tiere in Einzelkäfigen ($18{,}5 \times 10 \times 8$ cm) mit ausgeschnittenem Plexiglasdeckel verwahrt. Der Innenraum der Behältnisse wurde ihren Körpermaßen angepaßt, so daß sie eine gleichbleibende

Lage einnahmen. Wiederverwendung der Tiere im Abstand von 1 Woche. Berechnung der Versuchsergebnisse nach LITCHFIELD u WILCOXON.

## Ergebnisse.

Zur Prüfung von 14 schmerz- und hustenstillenden Mitteln wurden 400 Ratten verwandt. Aus den Testergebnissen konnten die effektiven Dosen für beide Wirkungsqualitäten mit den vertretbaren Grenzen für 19/20 Wahrscheinlichkeit sowie die Neigungswinkel der Wirkungsgeraden mit ihren Grenzen und der Quotient: analgetische zu hustenhemmende ED 50 berechnet werden. (Die vertretbaren Grenzen des Quotienten ließen sich nicht bei allen Prüfsubstanzen errechnen.) Die Arzneimittel sind in der Tab. 1 der Größe des Quotienten nach zusammengefaßt:

Es zeigte sich, daß im ganzen die Hemmung des Schmerzreflexes ähnliche Arzneimitteldosen erforderte wie die Verhütung des Hustens. Im einzelnen aber konnten Eukodal, Morphium, Hoechst 10582 (der Tikarda-Wirkstoff) und Cliradon den Schmerz schon bei geringerer Dosierung hemmen als den Husten, während die übrigen Substanzen stärker hustenhemmend wirkten. Racemisches Polamidon sowie die l- und d-Formen von Polamidon und Isopolamidon hatten sowohl analge-

Tabelle 1. *Wirkungsquotient, analgetische und hustenhemmende $ED_{50}$ und Neigungswinkel S der an Ratten untersuchten Substanzen.*

| | $\frac{\text{analgetisch}}{\text{hustenhemmend}}$ $ED_{50}$ | analgetisch $ED_{50}$ | Neigungswinkel S | hustenhemmend $ED_{50}$ | Neigungswinkel S |
|---|---|---|---|---|---|
| Eukodal | 0,53 | 0,48 ( 0,43— 0,55) | 1,3 (1,16—1,45) | 0,9 ( 0,79— 1,02) | 1,45 (1,16— 1,81) |
| Morphium | 0,76 | 2,3 ( 2,16— 2,43) | 1,18 (1,08—1,28) | 3,0 ( 2,5 — 3,6 ) | 1,7 (1,17— 2,46) |
| Hoechst 10582 | 0,82 | 5,8 ( 5,57— 6,03) | 1,2 (1,11—1,29) | 7,0 ( 5,0 — 9,8 ) | 2,75 (0,68—11,0 ) |
| Cliradon | 0,85 | 1,5 ( 1,37— 1,63) | 1,3 (1,12—1,50) | 1,75 ( 1,41— 2,17) | 1,8 (0,81— 3,96) |
| d-Polamidon | 1,11 | 30,0 (28,5 —31,5 ) | 1,14 (0,96—1,34) | 27,0 (25,4 —28,6 ) | 1,2 (1,01— 1,41) |
| l-Isopolamidon | 1,21 | 1,7 ( 1,42— 2,02) | 1,7 (0,65—4,42) | 1,4 ( 1,2 — 1,62) | 1,5 (1,0 — 2,25) |
| d-Isopolamidon | 1,27 (1,20—1,33) | 28,0 (26,6 —29,4 ) | 1,16 (0,96—1,39) | 22,0 (19,8 —24,4 ) | 1,34 (0,99— 1,8 ) |
| Codein | 1,3 (1,05—1,59) | 13,0 (11,6 —14,56) | 1,4 (1,07—1,82) | 10,0 ( 8,4 —11,9 ) | 1,6 (1,1 — 2,28) |
| Dicodid | 1,42 (1,05—1,91) | 1,9 ( 1,79— 2,01) | 1,3 (1,12—1,50) | 1,33 ( 1,14— 1,54) | 1,54 (1,02— 2,31) |
| Dolantin | 1,46 (1,05—2,01) | 8,2 ( 7,32— 9,18) | 1,4 (1,03—1,89) | 5,6 ( 4,14— 7,56) | 2,3 (0,69— 7,59) |
| l-Polamidon | 1,48 (1,09—1,99) | 1,1 ( 0,84— 1,43) | 2,1 (0,6 —7,35) | 0,74 ( 0,64— 0,85) | 2,0 (1,38— 2,9 ) |
| Polamidon | 1,8 (1,38—2,34) | 1,8 ( 1,53— 2,1 ) | 1,6 (0,8 —3,2 ) | 1,0 ( 0,81— 1,23) | 1,8 (1,33— 2,43) |
| Narkotin | | > 200,0 | | 16,0 (13,8 —18,56) | 1,5 (1,08— 2,07) |
| Romilar | | > 200,0 | | 18,0 (13,3 —24,3 ) | 2,3 (0,88— 5,98) |

tische als auch hustenhemmende Wirkung. Zur Hemmung des Hustens waren von jeder der 5 Substanzen etwas kleinere Dosen erforderlich. Die linksdrehenden Spaltlinge waren im ganzen wesentlich wirksamer als die rechtsdrehenden. Narkotin und Romilar hatten ausschließlich hustenhemmende Wirkung. Sie wurden zusätzlich an Meerschweinchen getestet; hier zeigten sie ebenfalls nur hustenhemmende, keine analgetische Wirkung. Ergebnisse in Tab. 2:

Tabelle 2. *Analgetische und hustenhemmende ED 50 zentral hustenhemmender Arzneimittel. Versuche an Meerschweinchen.*

| | analgetische $ED_{50}$ mg/kg | hustenhemmende $ED_{50}$ mg/kg |
|---|---|---|
| Codein | 48,5 (43,3—54,32) | 8,0 ( 6,1 —10,4) |
| Romilar | $> 100$[1] | 14,0 (12,06—16,24) |
| Narkotin | $> 200$ | 18,5 (15,54—22,01) |

[1] Romilar verursachte oberhalb von 100 mg/kg Vergiftungserscheinungen.

## Besprechung.

Die an Ratten gewonnenen Ergebnisse bestätigen und erweitern unsere früheren Befunde an Meerschweinchen. Eine Parallelität von analgetischer und hustenhemmender Wirkung morphinähnlicher Analgetica läßt sich auch an Ratten nicht nachweisen. Doch verhalten sich Ratten nicht in allen Einzelheiten wie Meerschweinchen. Alle Prüfsubstanzen wirken bei der Ratte in wesentlich geringerer Dosis analgetisch als beim Meerschweinchen. Demzufolge liegen analgetisch und hustenhemmend wirkende Dosen in einem ähnlichen Bereich.

Einzelne Medikamente zeigen an der Ratte eine andere Wirkungsspezifität als beim Meerschweinchen. Dolantin z. B., für das Meerschweinchen ein stärkeres Analgeticum als Hustenmittel, hemmt bei der Ratte bevorzugt den Husten. Die Spezifität von Morphium und Codein ist aber bei beiden Tierarten dieselbe. So findet die schon früher von uns geäußerte Ansicht, daß die Wahl der Versuchstierart das Ergebnis der vergleichenden Prüfung von analgetisch und hustenhemmend wirkenden Stoffen wesentlich beeinflußt, seine Bestätigung.

Diese Erfahrung erleichtert das Verständnis für Unterschiede, die zwischen einigen Ergebnissen von Winter u. Flataker (1) und eigenen bestehen. Diese Autoren fanden, daß die d-Formen von Polamidon und Isopolamidon im Vergleich zu den l-Formen fast keine analgetische, zugleich aber kräftig hustenhemmende Wirkung haben. In unseren Versuchen an Ratten ergab sich eine so große Wirkungsdifferenz nur hin-

sichtlich der Wirkungsstärke, nicht aber bezüglich der analgetischen oder hustenhemmenden Spezifität. Da WINTER u. FLATAKER jede Wirkung an einer anderen Tierart prüften, halten wir ihre Angaben über die Wirkungsspezifität dieser Spaltlinge für unsicher.

Aus den Versuchen von WINTER u. FLATAKER (2), PELLMONT u. BÄCHTOLD und eigenen Versuchen geht hervor, daß von den zur Zeit therapeutisch verwandten Stoffen zwei im Tierversuch ausschließlich hustenhemmend wirken: Narkotin und die d-Form des 3-Methoxy-N-methylmorphinan-hydrobromids „Romilar". Es zeigte sich, daß sie sowohl bei der Ratte als auch beim Meerschweinchen selbst in 10fach höherer Dosierung, als sie zur Hustenhemmung notwendig ist, nicht analgetisch wirken. Wir schlagen vor, diese Stoffe, die ausschließlich hustenhemmend wirken, sich darüber hinaus auch hinsichtlich der suchtbildenden Wirkung von morphinähnlichen Analgetica unterscheiden, in einer gesonderten Gruppe dem System der pharmakologischen Wirkstoffe einzuordnen: als *typische zentrale Hustenhemmer*.

Die jetzt an Ratten und früher an Meerschweinchen erhaltenen Befunde zeigen, daß die Hypothese von SCHAUMANN, Morphin und morphinähnliche Analgetica besäßen parallelgehende hustenhemmende und analgetische Wirkung, keine allgemeine Gültigkeit haben kann. Für die relative Unabhängigkeit dieses Schutz- und Warnreflexes von anderen sprechen auch die Befunde von HAAS, der nachgewiesen hat, daß zwischen der atmungs- und hustenhemmenden Wirkung der Analgetica keine Parallelität besteht. Insofern ist das Auffinden von Stoffen, die weder analgetisch noch atmungshemmend wirken, aber doch den Husten verhüten, nicht überraschend.

## Zusammenfassung.

An Ratten wird die schmerz- und hustenstillende Wirkung von 14 Prüfsubstanzen bestimmt, von denen 12 zur Gruppe der morphinähnlichen Analgetica gehören. Eukodal, Morphium, Hoechst 10582 und Cliradon dämpfen den Schmerzreflex bei geringerer Dosierung als den Hustenreflex. d-Polamidon, l-Isopolamidon, d-Isopolamidon, Codein, Dicodid, Dolantin, l-Polamidon und Polamidon unterdrücken zuerst den Husten. Narkotin und Romilar haben nur hustenhemmende, keine analgetische Wirkung. Die von SCHAUMANN postulierte Parallelität zwischen hustenhemmender und analgetischer Wirkung morphinähnlicher Analgetica kann bei Ratten ebensowenig wie früher bei Meerschweinchen nachgewiesen werden. Narkotin und Romilar werden als Vertreter einer neuen Gruppe pharmakologischer Wirkstoffe, der typischen zentral angreifenden Hustenhemmer, angesehen.

Frl. Christel Doll danken wir für ihre wertvolle Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Versuche, den Farbwerken Hoechst für einige Prüfsubstanzen.

## Literatur.

Friebel, H., C. Reichle u. A. v. Graevenitz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 384 (1955). — Haas, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 442 (1955). — Litchfield, J. T. jr., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Pellmont, B., u. H. Bächtold: Schweiz. med. Wschr. **1954**, 1368. — Schaumann, O.: Wien. klin. Wschr. **1953**, 133. — Winter, C. A., and L. Flataker: 1. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 463 (1952). — 2. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 99 (1954).

Doz. Dr. H. Friebel, Pharmakol. Institut der Universität Bonn, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmokol. Bd. 226, S. 563—569 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke).

# Die Wirkung von Biscarbaminoylcholinestern auf das Endplattenpotential, untersucht am Musculus gracilis der Katze.

Von
B. Pillat, P. H. Clodi, O. Kraupp und G. Werner.

Mit 3 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 17. Mai 1955.)*

Die pharmakologischen Untersuchungen von verschiedenen Substanzen der Polymethylenbiscarbaminoylcholin-Reihe hatten ergeben, daß diese sowohl neuromuskulär lähmende Wirkungen als auch eine Hemmwirkung auf Acetylcholinesterase und Serumcholinesterase besitzen[2, 4, 8]. Interessanterweise war die Hemmung beider Esterasen nicht vom Auftreten muscarinartiger Wirkungen begleitet[5, 8]. Die neuromuskulär lähmende Wirkung wies zunächst solche Eigenschaften auf, die als charakteristisch für Muskellähmung durch Depolarisation angesehen werden[8, 9]; an der Ratte war hingegen beobachtet worden, daß die Lähmung durch Prostigmin aufgehoben werden konnte[6]. Für die Octamethylenverbindung dieser Reihe (BC 9) zeigten Kobinger und Kraupp[10] ferner, daß diese die Curarelähmung am Rattenzwerchfell keineswegs aufhebt, was sowohl entsprechend ihrer Esterasehemmwirkung als auch auf Grund ihrer depolarisierenden Eigenschaften zu erwarten gewesen wäre; vielmehr wurde im Verlauf dieser Versuche die Feststellung gemacht, daß eine durch gleichzeitiges Einwirken von d-Tubocurarin (d-TC) und BC 9 hervorgerufene Lähmung an diesem Präparat durch Eserinzusatz prompt aufgehoben wird, wobei das Ausmaß der antagonistischen Wirksamkeit von Eserin von dem Konzentrationsverhältnis von BC 9 zu d-TC in der Suspensionslösung des Zwerchfelles abhing: Es wurde daraus geschlossen, daß sich an der motorischen Endplatte ein Grenzflächengleichgewicht zwischen d-TC und BC 9 einstellt und nun der bekannte Curare-Eserin-Antagonismus nach Maßgabe der prozentuellen Besetzung der Endplattenfläche mit d-TC in Erscheinung treten konnte.

Die Frage der Wechselwirkung zwischen d-TC, BC 9 und Eserin wurde nunmehr mittels elektrophysiologischer Methoden mit der Absicht untersucht, die ursprünglichen Befunde von Kobinger und Kraupp[10] zu be-

stätigen bzw. zu erweitern und um tatsächlich festzustellen, ob die wechselseitige Beeinflussung der Wirksamkeit der Partner des genannten Dreistoffsystems in Größenveränderungen des Endplattenpotentials (EPP) einen Ausdruck findet. Zum Vergleich wurde in einigen Versuchen an Stelle von BC 9 die homologe Hexamethylenverbindung BC 16 sowie Decamethonium (C 10) verwendet.

## Methodik.

Die Versuche wurden an Katzen in Chloralosenarkose (80 mg/kg) durchgeführt. Endplattenpotentiale wurden vom Musculus gracilis in der von Brown angegebenen Weise[1] abgeleitet, wobei während des Versuches die Muskeloberfläche mit körperwarmem Paraffin bedeckt war. Elektrische Reizung des zugehörigen Nerven sowie Ableitung der Aktionspoteniale erfolgte über Platindrahtelektroden. Die Ableitung der EPP erfolgte in allen Versuchen von der im distalen Drittel des Musculus gracilis gelegenen Endplattenzone, die nach Eintritt einer Muskellähmung durch eine der Versuchssubstanzen aufgesucht wurde.

Als Reizgerät wurde ein Rechteckimpulsgenerator Grass S-4 verwendet; die Registrierung erfolgte mit dem Philips Kathodenstrahloszillographen GM-3156 und der Grass Kymokamera Typ C 4-C, nach Vorverstärkung durch den Grass-Verstärker P 4-A. Es wurde stets supramaximal gereizt; der Reizstrom wurde zur Unterdrückung des Reizeinbruches über ein „Stimulus-Isolation-Unit" (Grass Modell SIU-4) zugeleitet.

Die Substanzen BC 9* und BC 16* wurden als Chloride verwendet; C 10* gelangte als Jodid zur Anwendung.

## Versuchsergebnisse.

Zunächst wurden durch intravenöse Einzelinjektionen der Versuchssubstanzen BC 9 und BC 16 die Dosen angenähert bestimmt, durch die die Höhe des EPP bei Einzelreizen auf jenen kritischen Wert erniedrigt wurde, der nicht mehr zur Auslösung fortgeleiteter Muskelimpulse ausreichte. Diese Dosis betrug bei BC 9 etwa 50 $\mu$g/kg und bei BC 16 etwa 30 $\mu$g/kg. Vor Eintritt der Lähmung wurde dabei regelmäßig mehr oder weniger stark ausgeprägtes Muskelfasciculieren beobachtet. Zum Zeitpunkt der eben eingetretenen Lähmung war die Höhe des von der Muskeloberfläche abzuleitenden EPP etwa gleich hoch wie in Fällen einer Lähmung durch d-TC mit Schwellendosen, während bei Verwendung von C 10 als Vergleichsubstanz zwei- bis dreimal höhere EPP registriert wurden (vgl. Abb. 2 und 3). Der Unterschied der kritischen Höhe des EPP bei Lähmung durch d-TC bzw. C 10 wurde bereits von Burns u. Paton beschrieben[3].

Im Verlaufe von kurzdauernder tetanischer Reizung sank die Höhe des EPP weiterhin ab, wobei schon eine Frequenz von 5/sec ausreichte, um nach einer Reizdauer von 1—2 sec die Höhe des EPP um 10—30% herabzusetzen. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die Lähmung

* Für die Überlassung der Versuchssubstanzen danken wir der Österr. Stickstoffwerke A.G., Linz.

durch d-TC in vergleichenden Versuchen beobachtet bzw. von LILEY and NORTH[11] für das isolierte Rattenzwerchfell beschrieben; C 10 verhielt sich in dieser Hinsicht in unseren Versuchen gleichartig.

Der Einfluß tetanischer Reizung auf die Höhe des EPP wurde in weiteren Versuchen dazu benutzt, um die kritische Höhe des EPP, d. h. jene Höhe, bei der eine Überleitung der Erregung auf den Muskel eben noch erfolgt, genauer zu bestimmen: es wurden den Tieren nur partiell lähmende Dosen der Versuchskörper verabfolgt und im Zustand der teilweisen Lähmung die Oszillogramme während tetanischer Reizung übereinander photographiert. Aus den so erhaltenen Bildern (Abb. 1) konnte nun die Höhe des EPP, bei der eben ein glatter exponentieller Abfall ohne aufgesetzte Muskelpotentiale der umgebenden Fasern erstmalig auftrat, abgelesen werden. Es ergab sich dabei in 7 Versuchen, daß die relative Höhe des von gleichen Stellen der Muskeloberfläche abzuleitende EPP nach Lähmung mit BC 9 bzw. BC 16 etwa jener bei Lähmung durch d-TC entsprach. Je geringer die zur Anwendung gelangende Dosis des muskellähmenden Stoffes war, desto höhere Reizfrequenzen waren erforderlich, um ein von Muskelaktionsströmen freies EPP zu erhalten, d. h. Dosis der muskellähmenden Stoffe und Reizfrequenz verhielten sich in bezug auf die Erniedrigung des EPP gewissermaßen additiv.

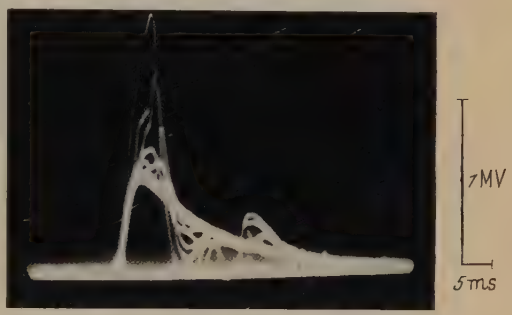



Abb. 1. Muskelaktionspotentiale bzw. Endplattenpotentiale, abgeleitet von der Oberfläche des Musculus gracilis der Katze bei tetanischer Reizung (5 pro sec; es wurden 15 Reize appliziert und die zugehörigen Oscillogramme übereinander photographiert); 6 min vor Reizbeginn wurden 0,6 mg/kg d-Tubocurarin intravenös injiziert. Die zunehmend kleiner werdenden Muskelaktionspotentiale wurden durch die ersten 5 Reize ausgelöst, die nachfolgenden Reize ergaben das Endplattenpotential.

Die Wirkung von BC 9 und BC 16 auf die Erniedrigung des EPP dauerte zumindest 50—60 min an und erst nach dieser Zeit erfolgte eine allmähliche Größenzunahme des EPP. Die lange Wirkungsdauer ermöglichte die Durchführung der Untersuchung von antagonistisch wirkenden Substanzen nach Verabfolgung von Einzeldosen von BC 9 und BC 16, ohne daß innerhalb der Beobachtungsperiode ein störender Einfluß in Form der Spontanerholung zu erwarten war.

Im Verlauf von 5—10 min nach zusätzlicher intravenöser Injektion von Eserin in Dosen von 0,2—0,4 mg/kg war eine deutliche Erhöhung sowie Verlängerung des EPP zu beobachten, die jedoch in keinem der Versuche dafür ausreichte, Muskelaktionspotentiale auszulösen. Dieser Zustand blieb während einer Beobachtungsdauer von 20—40 min prak-

tisch unverändert bestehen, änderte sich aber dann plötzlich, wenn zusätzlich d-TC in einer Dosis von 100 $\mu$g/kg intravenös injiziert wurde: in

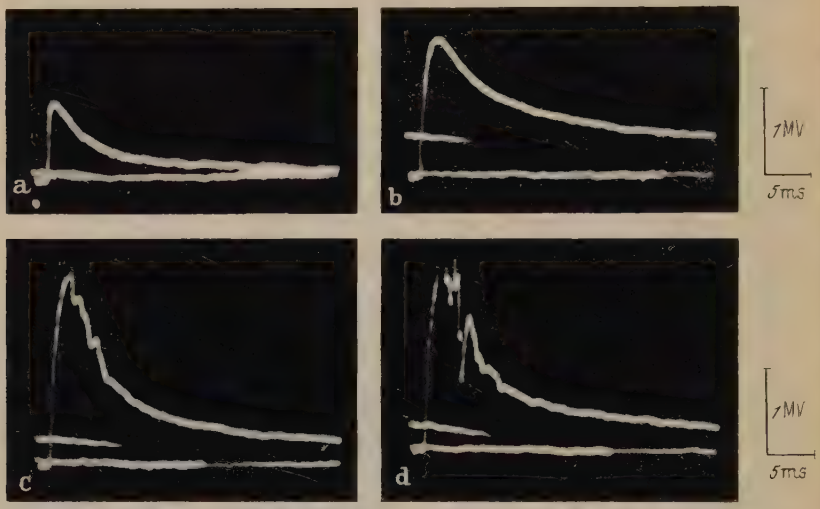



Abb. 2. Endplattenpotentiale, abgeleitet vom Musculus gracilis der Katze.
a) 10 min nach intravenöser Injektion von 30 $\mu$g/kg BC 16;
b) 6 min nach a, 4 min vor der Aufnahme wurden 0,2 mg/kg Eserin intravenös injiziert;
c) und d) 1 bzw. 2 min nach intravenöser Injektion von 100 $\mu$g d-Tubocurarin (Aufnahme c erfolgte 10 min nach b).

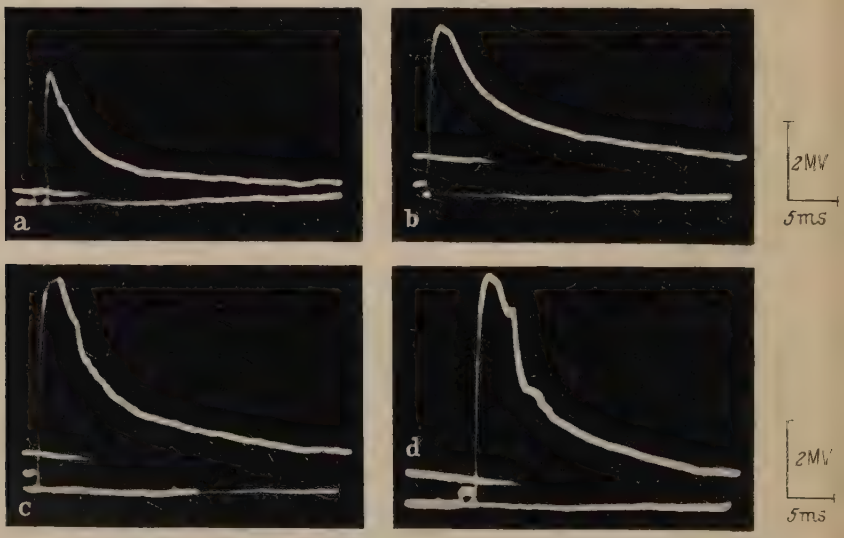



Abb. 3. Endplattenpotentiale, abgeleitet vom Musculus gracilis der Katze.
a) 5 min nach intravenöser Injektion von 380 $\mu$g/kg Decamethonium;
b) 7 min nach a, 5 min vor der Aufnahme wurden 0,3 mg/kg Eserin intravenös injiziert;
c) und d) 1,5 bzw. 2 min nach intravenöser Injektion von 100 $\mu$g/kg d-Tubocurarin (Aufnahme c erfolgte 4 min nach Aufnahme b).

diesem Falle kam es im Verlauf von 1—2 min zu einer weiteren Erhöhung des EPP und zum Auftreten von Muskelaktionspotentialen. Ein derartiger Versuch ist in Abb. 2 für BC 16 wiedergegeben. Genau die gleichen Verhältnisse wurden beobachtet, wenn die anfängliche Muskellähmung durch C 10 herbeigeführt wurde (Abb. 3).

Schließlich wurde noch untersucht, ob und in welcher Weise das durch d-TC erniedrigte EPP durch BC 16 bzw. BC 9 verändert wird: es wurde dabei lediglich eine weitere Erniedrigung des EPP beobachtet, wenn diese Substanzen in Dosen von 50—100 $\mu$g/kg kurz nach Eintritt der Curarelähmung intravenös injiziert wurden. Andererseits konnte durch Eserin erwartungsgemäß innerhalb von wenigen Minuten eine ausgeprägte Erhöhung des EPP bzw. ein Wiederauftreten von Muskelaktionspotentialen an den durch d-TC gelähmten Muskeln herbeigeführt werden.

## Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Versuchssubstanzen BC 9 und BC 16 sind, wie in vorangegangenen Mitteilungen gezeigt wurde[2, 5], starke Hemmkörper der Cholinesterasen; ihre neuromuskulär lähmende Wirkung steht jedoch offensichtlich damit in keinem Zusammenhang, da sie keine Erhöhung des durch d-TC herabgesetzten EPP bewirken, vielmehr wird die durch diese Substanzen bewirkte Lähmung durch Eserin zumindest insofern antagonistisch beeinflußt, als es zu einer Verlängerung und Erhöhung des erniedrigten EPP kommt. Bemerkenswert ist noch die hochgradige Herabsetzung des EPP, die erforderlich ist, um ein Ausbleiben von Muskelaktionspotentialen zu bewirken: demzufolge verhalten sich BC 9 und BC 16 hinsichtlich der Höhe des kritischen EPP ähnlich wie d-TC und verschieden von C 10, bei dem die Lähmung schon bei verhältnismäßig hohem EPP eintritt. Wenn das von Burns u. Paton[3] vorgebrachte Argument zu Recht besteht, wonach die Höhe des kritischen EPP ein Maßstab dafür ist, inwieweit durch eine muskellähmende Substanz die Erregbarkeit der endplattennahen Muskelmembran beeinflußt wird, müßte bei Einwirkung von BC 9 bzw. BC 16 eine geringergradige Herabsetzung der Erregbarkeit endplattennaher Anteile der Muskelmembran angenommen werden als im Falle von C 10. Die aus dem Verhalten des EPP zu schließenden Eigenschaften von BC 9 und BC 16 sprechen somit für eine curareähnliche, auf die Endplattenzone beschränkte Wirksamkeit. Dazu im Gegensatz stehen die muskulär erregenden Wirkungen sowie die nach BC 9 beobachtete Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur, die die Biscarbaminoylcholinester als depolarisierende Substanzen charakterisieren[9]. Offensichtlich handelt es sich dabei um Stoffe, die sowohl depolarisierende, als auch competitiv lähmende Eigenschaften besitzen, wobei damit zu rechnen ist, daß die depolarisierenden

Eigenschaften zum Zeitpunkt des Wirkungseintrittes (z. B. das initiale Fasciculieren) überwiegen, während mit längerer Einwirkung auf die Muskulatur die competitiven Eigenschaften zunehmend in den Vordergrund treten. Ähnliche Verhältnisse wurden für die Einwirkung von C 10 auf den isolierten Musculus lumbricalis des Kaninchens beschrieben[7].

Die Versuche zusätzlicher Injektionen kleiner Curaredosen nach Eserin-Vorbehandlung des mit BC 9 bzw. BC 16 gelähmten Muskels lieferten Ergebnisse, die mit den ursprünglichen Befunden von Kobinger u. Kraupp[10] am Rattenzwerchfell in guter Übereinstimmung stehen: die Annahme, daß d-TC einen Teil des BC 9 bzw. BC 16 von der Endplatte zu verdrängen vermag und diese bei gleichzeitiger Anwesenheit von Eserin wieder für die depolarisierende Wirkung der Überträgersubstanz empfindlich macht, steht mit den beobachteten Veränderungen des EPP in Einklang. Die Beobachtung, daß nach Lähmung durch C 10 und Injektion von Eserin erst durch zusätzliche Verabreichung von d-TC die kritische Höhe des EPP erreicht wird, spricht dafür, daß auch diese Substanz durch d-TC von der Receptoroberfläche der Endplatte verdrängt werden kann.

## Zusammenfassung.

1. Die kritische Höhe des von der Oberfläche des Musculus gracilis von Katzen abzuleitenden Endplattenpotentials ist im Zustande der Lähmung durch Octamethylen (BC 9) — bzw. Hexamethylen (BC 16) —, Biscarbaminoylcholin und d-Tubocurarin angenähert gleich, während die Endplattenpotentiale bei Lähmung durch Decamethonium in Schwellendosen etwa zwei bis dreimal höher sind.

2. Eserin bewirkt eine Verlängerung und Erhöhung des Endplattenpotentials des durch BC 9, BC 16 und Decamethonium gelähmten Muskels, ohne daß dabei der Wert des kritischen Endplattenpotentials erreicht wird.

3. Das durch Eserin verlängerte und erhöhte Endplattenpotential des durch BC 9, BC 16 und Decamethonium gelähmten Muskels wird durch Injektion von d-Tubocurarin prompt auf den Wert des kritischen Endplattenpotentials erhöht, so daß nunmehr fortgeleitete Muskelaktionspotentiale auftreten.

## Literatur.

[1] Brown, G. L., and B. D. Burns: A conveniant nerve muscle preparation from the Gracilis of the cat. J. of Physiol. **108**, 54 (1949). — [2] Bruecke, F., H. Klupp und O. Kraupp: Pharmakologische Eigenschaften des Hexamethylenbiscarbaminoylcholins und anderer verwandter Biscarbaminoylcholine. Wien. Klin. Wochschr. **1954**, 260. — [3] Burns, B. D., and W. D. M. Paton: Depolarisation of the motor endplate by Decamethonium and Acetylcholine. J. of Physiol. **115**, 41 (1951). — [4] Cheymol, J., R. Delaby, P. Chabrier, H. Najer et F. Bourillet: Activité acetylcholinomimétique de quelques derivés de la carbamoylcholine. Arch. internat.

Pharmacodynamie **98**, 161 (1954). — [5] Herzfeld, E., u. Ch. Stumpf: Zur Frage der Cholinesterase-Hemmwirkung der Polymethylen-bicarbaminsäure-Bischolinester. Arch. internat. Pharmacodynamie **100**, 391 (1955). — [6] Herzfeld, E., O. Kraupp u. Ch. Stumpf: Antagonisten von Hexamethylenbiscarbaminoylcholin (Imbretil). Anaesthesist, im Druck. — [7] Jenden, D. J., K. Kamijo and D. B. Taylor: The action of Decamethonium on the isolated lumbrical muscle. J. of Pharmacol. **111**, 229 (1954). — [8] Klupp, H., O. Kraupp, H. Stormann u. Ch. Stumpf: Über die pharmakologischen Eigenschaften einiger Polymethylendicarbaminsäurebischolinester. Arch. internat. Pharmacodynamie **96**, 161 (1953). — [9] Klupp, H., u. O. Kraupp: Über die Freisetzung von Kalium aus der Muskulatur unter der Einwirkung einiger Muskelrelaxantien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 340 (1954). — [10] Kobinger, W., u. O. Kraupp: Über die Wechselwirkung von d-Tubocurarin, Eserin und depolarisierenden Substanzen am isolierten Rattenzwerchfell, untersucht am Beispiel des Octamethylenbiscarbaminoylcholins. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 237 (1955). — [11] Liley, W., and K. A. K. North: cit. aus: J. C. Eccles, The neurophysiological basis of mind. Oxford 1952.

Dr. B. Pillat, Wien/Österreich, Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 226, S. 570—576 (1955).

Aus der Univ. Frauenklinik Tübingen
(Komm. Direktor: O. A. Doz. Dr. V. Probst).

# Cytologische und toxicologische Untersuchungen über die Beeinflussung der Colchicinwirkung durch Megaphen.

Von
Karl Peters.

Mit 3 Textabbildungen.

*(Eingegangen am 25. Juli 1955.)*

In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, daß bei Vicia faba (Peters u. Lehr 1954) und beim Ehrlichschen Ascitestumor der Maus (Peters, Gärtner u. Krais 1955) die Mitosehäufigkeit durch Megaphen [N-(3′-Dimethylamino)-propyl-3-chlorphenothiazin] vermindert wird. Durch die Kombination von Megaphen und Radium -$\gamma$-Strahlen war es bei Vicia faba (Peters 1954) und im Ascitestumor der Maus (Peters, Gärtner u. Krais 1955) möglich, eine verstärkte Strahlenwirkung hervorzurufen. Da die Wirkung eines physikalischen Agens durch Megaphen gesteigert wird, war es naheliegend auch ein chemisch wirkendes Agens, welches auf die Zelle wirkt, zu untersuchen. Als cytostatische Substanz wurde Colchicin verwendet, weil der durch Colchicin hervorgerufene Metaphasestop morphologisch deutlich zum Ausdruck kommt und die Toxizität bekannt ist. Es war wünschenswert, neben der Frage nach einer Wirkungssteigerung des Colchicineffektes durch Megaphen auf die Mitose, festzustellen, ob außerdem die Toxicität gleich bleibt oder ebenfalls zunimmt.

## Material und Methoden.

Ascitestumorzellen (Stamm Elberfeld), die weiblichen weißen Mäusen intraperitoneal injiziert worden waren, dienten zur Ermittlung der cytologischen Wirkungen. 6 Tage nach der Überimpfung der Tumorzellen erhielten 20 Mäuse eine einmalige subcutane Injektion von 0,5 mg/20 g Kgw. Megaphen, was einer $^1/_4$ $DL_{50}$ entspricht. Gleichzeitig wurde ohne Rücksicht auf das Körpergewicht 2 $\gamma$ Colchicin (Merck) in physiologischer Kochsalzlösung i. p. injiziert. Weitere 20 Tiere erhielten nur 2 $\gamma$ Colchicin i. p. Es wurde eine Dosis von 2 $\gamma$ Colchicin gewählt, um eine evtl. auftretende Steigerung des Colchicineffektes durch Megaphen besser erfassen zu können. Nach Bayreuther (1952) werden 15 $\gamma$ Cholchicin benötigt, um im Ascitestumor der Maus nach 18 Std etwa 30% der Mitosen in der Metaphase zu blockieren. Von 10 Tieren jeder Versuchsreihe wurde 12, 24, 48 und 96 Std nach der Injektion von Colchicin bzw. Colchicin + Megaphen $^1/_{10}$ cm³ Ascites für die Ausstriche ent-

nommen. Die Ausstriche wurden über der Flamme fixiert, nach Feulgen gefärbt und mit Lichtgrün (Bayer) gegengefärbt. Jedem Untersuchungszeitpunkt liegen durchschnittlich 4400 Zellen mit etwa 195 Mitosen zugrunde. — Zur statistischen Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzelnen zu vergleichenden Mitosehäufigkeitskollektiven wurde die t-Verteilung nach Fisher (1938) und die von Koller (1953) berechnete Sicherheitsgrenze (P) für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,27% herangezogen.

Die Frage der Beeinflussung der Toxicität von Colchicin durch Megaphen wurde in einer weiteren Versuchsreihe geklärt. Als Kriterium wurde dazu die Überlebensrate von weiblichen weißen Mäusen herangezogen. Es wurden 2 Versuchsreihen von je 54 Tieren gebildet, von denen die eine Reihe nur Colchicin und die andere Reihe Colchicin + Megaphen erhielt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 30 Tage. Das Tiermaterial darf als weitgehend einheitlich angesehen werden, da alle Mäuse aus der gleichen Zucht stammten und die Durchschnittsgewichte in beiden Reihen mit 32,2 ± 6,3 g und 32,2 ± 5,2 g praktisch gleich sind. Alle Tiere (108) erhielten im Abstand von 48 Std insgesamt 2mal 0,0012 g/kg Körpergewicht Colchicin i. p. injiziert. Zum gleichen Zeitpunkt erhielten 54 Tiere einer Reihe zusätzlich bei jeder Injektion 0,5 mg/20 g Körpergewicht Megaphen subcutan injiziert. Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den beiden Überlebensraten wurde das T-Verfahren nach v. Schelling (1937) verwendet.

Alle Tiere wurden 14 Tage vor dem Versuchsbeginn zur Eingewöhnung unter den gleichen Lebensbedingungen gehalten, wie sie während des Versuches bestanden. Als Futter bekamen die Tiere 2mal täglich ausreichend Hafer, getrocknetes Brot und Wasser.

## Versuchsergebnisse.

### I. Beeinflussung der cytologischen Wirksamkeit von Colchicin durch Megaphen.

In der Abb. 1 sind die ermittelten mittleren Mitosehäufigkeiten nach 12, 24, 48 und 96 Std graphisch dargestellt. Unter der Einwirkung von 2 $\gamma$ Colchicin läßt sich nach 12 Std ein Mitosenmaximum beobachten. Nach 24 Std ist die Mitosehäufigkeit bereits vermindert und nach 48 bzw. 96 Std sind die niedrigsten Werte erreicht. Die Erfassung der Mitosehäufigkeiten im Ascites der Tiere, die Colchicin und Megaphen erhalten hatten, ergab einen von der Colchicinreihe deutlich verschiedenen Verlauf. Der 12 Std-Wert liegt niedriger als in der Colchicinreihe. Nach 24 Std ist die Mitosehäufigkeit der Reihe Colchicin + Megaphen gegenüber der Reihe, die nur Colchicin erhielt, signifikant erhöht (siehe Tab. 1). Der Mitoseindex nach 48 Std liegt noch oberhalb des Wertes der Colchicinreihe, während nach 96 Std ein Unterschied zwischen beiden Reihen nicht mehr festzustellen ist.

Da die Colchicinwirkung u. a. auf einer Depolymerisation der Micelle der Zellteilungsspindel beruht (Inoué 1952), die zu einem Zellteilungsstop in der Metaphase führt, ist die Verteilung der einzelnen Zellteilungsphasen von besonderem Interesse und auch für die Analyse der Megaphenwirkung von Bedeutung. In der Abb. 2 sind die einzelnen Mitosephasen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten aufgeführt.

Nach Colchicin ist, wie bei der geringen Dosis zu erwarten, nur nach 12 Std ein Metaphasestop festzustellen. Nach 24, 48 und 96 Std ist eine Wirkung von Colchicin auf die Blockierung der Metaphasen nicht mehr nachweisbar. Die Steigerung der relativen Häufigkeit der Prophasen nach 24 Std ließe gegebenenfalls auf eine Mitosenanregung schließen.

So wurde z. B. von Lits 1936; Lits, Kirschbaum u. Strong 1938; Ries 1938; Teir u. Ravanti 1953 angenommen, daß subletale Colchicindosen Mitosen stimmulieren und Metaphasen blockieren. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen

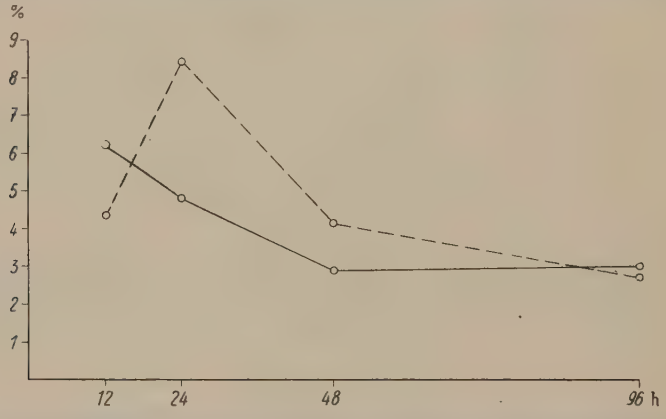



Abb. 1. Mitosehäufigkeitsverteilung im Ascitestumor der Maus nach der Injektion von 2 $\gamma$ Colchicin (o——o) bzw. 2 $\gamma$ Colchicin + 0,5 mg/20 g Kgw. Megaphen (o------o). Ordinate: Zahl der Mitosen in Prozent der Zellen. Abszisse: Einwirkungszeit in Stunden nach Versuchsbeginn.

von Brues 1936; Brues u. Cohen 1936, Ludford 1936; Allen u. Mitarb. 1937; Brues u. Marble 1937, Brues, Marble u. Jackson 1940; Dubilier u. Warren 1941, die zeigten, daß Colchicin in Konzentrationen von 1—2 $\gamma$/g Körpergewicht nur zu einem Mitosestop führt.

Das vermehrte Auftreten von Prophasen ist in den vorliegenden Ergebnissen nach 48 Std noch vorhanden, nach 96 Std jedoch nicht

*Tabelle 1.*

| mittl. Häufigkeiten nach 24 Std | Differenz der Mittelwerte $M_D$ | Differenz der Streuung $\sigma_D$ | Sicherungsgrenze $P$ | $t$-Werte | $t \cdot \sigma_D$ | $M_D \gtrless t \cdot \sigma_D$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mitosen | 4,11 | 0,83 | 0,27 % | 3,6 | 2,99 | > |
| Prophasen | 26,64 | 5,44 | 0,27 % | 3,6 | 19,60 | > |
| Metaphasen | 34,93 | 5,70 | 0,27 % | 3,6 | 20,50 | > |

mehr festzustellen. Betrachtet man neben den Phasenverteilungen die Mitosehäufigkeiten (Abb. 1), so fällt auf, daß bei den 24- und 48-Std-Werten, zu den Zeitpunkten des vermehrten Auftretens von Prophasen in der Colchicinreihe, die Mitosehäufigkeitskurve eine

fallende Tendenz aufweist. Es ist aus dem Befund, wie ursprünglich angenommen (PETERS, 1955), kaum möglich, den Effekt auf eine Mitoseanregung zurückzuführen. Vielmehr sprechen die Befunde für eine Verlangsamung des Ablaufes der Prophasen infolge der Einwirkung von Colchicin.

Die Mitosephasenverteilung in den Asciteszellen der Mäuse, die Colchicin in Kombination mit Megaphen erhalten hatten, ist deutlich verschieden von der Reihe, die nur Colchicin erhielt. Die Prophasen liegen nach 24 Std signifikant unterhalb des Wertes der Colchicinreihe. Der

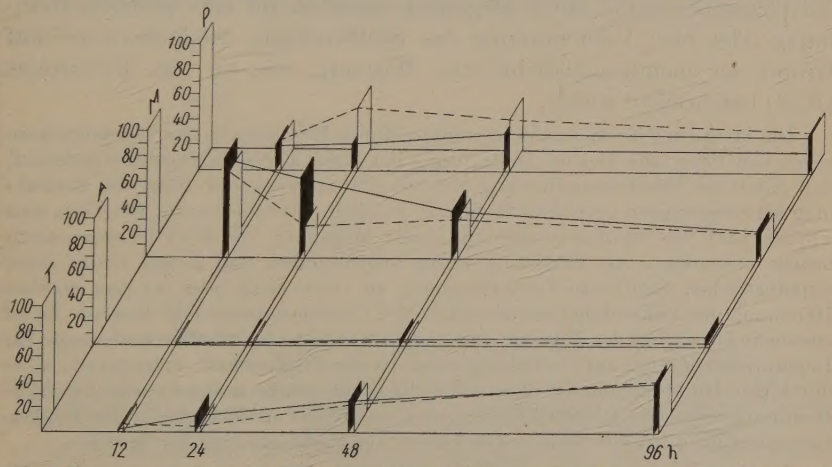



Abb. 2. Häufigkeitsverteilung der Zellteilungsphasen im Ascitestumor der Maus nach 2 $\gamma$ Colchicin (□) bzw. nach 2 $\gamma$ Colchicin + 0,5 mg/20 g Kgw. Megaphen (■). Ordinaten: Zellteilungsphasen in Prozent der Zahl der Mitosen. Abszissen: Einwirkungszeit der Agentien in Stunden nach dem Versuchsbeginn. *P* Prophasen, *M* Metaphasen, *A* Anaphasen, *T* Telophasen.

Metaphasewert ist bereits nach 12 Std höher als in der Colchicinreihe. Nach 24 Std ist der Unterschied zwischen beiden Reihen signifikant, siehe Tab. 1. Die Häufigkeitsdifferenz ist nach 48 Std geringer und nach 96 Std praktisch aufgehoben. Als zusätzliches Phänomen fällt auf, daß an den Beobachtungszeitpunkten von 48 und 96 Std vermehrt Anaphasen angetroffen werden.

*Diskussion.*

Aus dem Verlauf der Mitosehäufigkeitskurven (Abb. 1) und der Mitosephasenverteilung (Abb. 2) ist ersichtlich, daß durch die Kombination von Colchicin mit Megaphen die Intensität und die Dauer der Colchicinwirkung gesteigert wird. Die für Megaphen typische Erscheinung der Verminderung der Mitosehäufigkeit kommt in der Mitosehäufigkeitskurve (Abb. 1) in der gegenüber der ausschließlichen Colchicinwirkung geringeren Zahl der Mitosen nach 12 Std zum Ausdruck. Die relative Zunahme der Anaphasen nach 96 Std läßt in der Reihe Colchicin + Megaphen

ebenfalls die Einwirkung von Megaphen erkennen (Abb. 2). Die Verminderung der Mitosehäufigkeit und die relative Vermehrung der Anaphasen sind zwei Effekte, die beide an Vicia faba (Peters, 1954) und am Ascitestumor der Maus (Peters, Gärtner u. Krais 1955) beschrieben wurden. Da die relative Vermehrung der Anaphasen an pflanzlichen und an tierischen Zellen und unter solch verschiedenen Versuchsbedingungen wieder auftritt, scheint es sich um ein Charakteristikum der Megaphenwirkung zu handeln.

Die Herabsetzung der Mitosehäufigkeit und die Verlangsamung der Anaphasenbewegung durch Megaphen sprechen für eine partielle Hemmung oder eine Verminderung des Stoffwechsels, möglicherweise auf Grund der membranabdichtenden Wirkung, wie sie von Eichholtz (1954) beschrieben wurde.

Die Steigerung des Bestrahlungseffektes durch Megaphen in den Wurzelspitzenzellen von Vicia faba und im Ascitestumor der Maus wurde dahingehend gedeutet, daß durch die Membranabdichtung eine Ausschwemmung der durch die Bestrahlung hervorgerufenen toxischen Stoffe aus der Zelle verhindert wird. Bei Vicia faba wurden nach der Radiumbestrahlung unter Megaphen vermehrt Chromosomenbrüche beobachtet. Als Erklärung wurde angenommen, daß es auf Grund einer hypothetischen Stoffwechselverlangsamung zu einer mehr oder weniger starken Hemmung der Rekombinationshäufigkeit der Chromosomenbrüche kommt. Es ist anzunehmen, daß in der Zelle ein gewisser Prozentsatz der Stoffwechselenergie für Reparationsvorgänge zur Verfügung steht. Ist der Stoffwechsel verlangsamt, sei es durch eine Herabsetzung der chemischen Reaktionsgeschwindigkeit oder durch die Hemmung eines bestimmten Enzymsystems, so reicht die Energie für die Reparationsvorgänge nicht mehr aus und es kommt zur Manifestierung der Schäden.

In einem solchen Sinne dürften auch die Effekte zu deuten sein, die durch die kombinierte Anwendung von Colchicin + Megaphen auftreten. Ob die Energie nun für den Abbau oder die Inaktivierung des Megaphens verwendet wird oder zur vermehrten Bildung bestimmter Stoffe um eine partielle Blockierung zu kompensieren, ist eine Frage nach der Wirkungsursache, die mit physiologisch-chemischen Methoden zu beantworten wäre. Wenn nach der Einwirkung von Megaphen eine relative Vermehrung der Anaphasen in Erscheinung tritt und die Colchicinwirkung auf einer Depolymerisation der Micelle der Teilungsspindel beruht, so ist es auf Grund dieser beiden Erscheinungsbilder gut denkbar, daß beide Stoffe zusammen einen stärkeren Effekt bei der Hemmung der Zellteilungsvorgänge hervorrufen. Die Wirkungssteigerung von Colchicin durch Megaphen erscheint in der Erhöhung der Intensität und der Dauer der Metaphaseblockierung. Die Megaphenwirkung ist aus einer geringen Mitosesenkung nach 12 Std und einer Vermehrung der Anaphasen nach 96 Std ersichtlich. Es ist bemerkenswert, daß an der pflanzlichen, ebenso an der tierischen Zelle die Einwirkung von physikalischen (Radium) oder chemischen (Colchicin) Agentien durch die Kombination mit Megaphen eine Steigerung erfahren.

## II. Beeinflussung der Toxicität von Colchicin durch Megaphen.

Die Absterbefolgen der Reihen nach Colchicin bzw. Colchicin + Megaphen ist in der Abb. 3 dargestellt. In der Colchicinreihe starben in dem Versuchszeitraum von 30 Tagen von 54 Mäusen 15 = 27,8% während in der Reihe Colchicin + Megaphen von 54 Tieren 32 starben = 59,3%. Der Verlauf der beiden Absterbekurven ist weitgehend parallel. Zwischen dem 3. und 4. Tag sind bereits in beiden Reihen 50% der Todesfälle eingetreten.

Der statistische Vergleich zwischen beiden Reihen mit Hilfe des T-Verfahrens nach v. Schelling (1937) ergab für T einen Wert von 3,28.

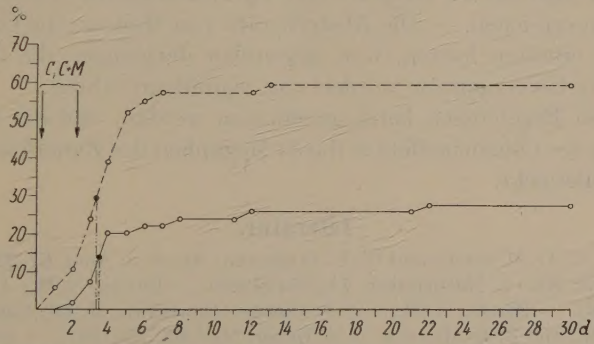



Abb. 3. Absterbefolge von Mäusen nach der Injektion von Colchicin (54 Tiere) bzw. Colchicin + Megaphen (54 Tiere). Ordinate: Gestorbene Tiere in Prozent der Gesamtzahl. Abszisse: Versuchsdauer in Tagen. •—···— 50% Grenze der Todesfälle in beiden Versuchsreihen. (o——o) Colchicin (2 × 0,0012 g/kg Kgw.). (o-------o) Colchicin (2 × 0,0012 g/kg Kgw.) + Megaphen (2 × 0,5 mg/20 g Kgw.).

Übereinkunftsgemäß muß $T > 3$ sein, wenn ein Zufallsergebnis ausgeschlossen werden soll. Es ist aus dem Ergebnis zu folgern, daß der Unterschied zwischen den Absterbefolgen in beiden Reihen statistisch gesichert ist.

*Diskussion.*

Die signifikante Zunahme der Absterberate durch die Kombination von Colchicin mit Megaphen deutet darauf hin, daß durch Megaphen die Toxicität gesteigert wird. Der weitgehend parallele Verlauf der beiden Absterbekurven und das fast gleichzeitige Erreichen der 50%-Grenze der Todesfälle läßt außerdem erkennen, daß die Toxicitätssteigerung offenbar in der für Colchicin charakteristischen Weise erfolgt. Der mögliche Einwand, daß bei dem Toxicitätsversuch die erhöhte Sterblichkeit durch eine zu hohe Megaphendosis hervorgerufen worden sei, kann insofern entkräftet werden, als die beiden Injektionen durch einen Zeitintervall von 48 Std getrennt waren. Die Wirkung der ersten Megapheninjektion von 0,5 mg/20 g Körpergewicht, die in ihrer Wirksamkeit einer $^1/_4$ $DL_{50}$ entspricht, ist bereits nach 24 Std aufgehoben. Es wurde zwar 2mal eine Dosis

entsprechend einer $^1/_4$ $DL_{50}$ injiziert. Die Dosen addieren sich jedoch infolge des gewählten Zeitabstandes nicht. Im Gegensatz dazu kann man bei der Verabreichung von 2mal 0,0012 g/kg Körpergewicht Colchicin i. p. von einer additiven Wirkung der beiden Dosen sprechen, da die Ausscheidung von Colchicin bekanntlich sehr viel langsamer erfolgt, so daß eine Gesamtdosis von 0,0024 g/kg Colchicin zur Wirkung kam.

## Zusammenfassung.

Durch die Kombination von kleinsten Colchicindosen mit Megaphen ist es möglich, im Ascitestumor der Maus die Zahl der in der Metaphase arretierten Mitosen zu steigern und ein verlängertes Anhalten dieses Effektes zu erreichen. — Die Absterberate von Mäusen, die Colchicin + Megaphen erhalten hatten, war, gegenüber derjenigen, die durch Colchicin allein hervorgerufen worden war, signifikant erhöht.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Wirkungssteigerung des Colchicineffektes durch Megaphen der Zunahme der Toxicidät parallel geht.

## Literatur.

Allen, E., G. M. Smith and W. U. Gardner: Amer. J. Anat. **61**, 321 (1937.) — Bayreuther, Kl.: Z. Naturforsch. **7b**, 554 (1952). — Brues, A. M.: J. of Physiol. **86**, 63 (1936). — Brues, A. M., and A. Cohen: Biochemic. J. **30**, 1363 (1936). — Brues, A. M., and B. B. Marble: J. of Exper. Med. **65**, 15 (1937). — Brues, A. M., B. B. Marble and E. B. Jackson: Amer. J. Cancer **38**, 159 (1940). — Dubilier, B., and S. L. Warren: Cancer Res. **1**, 966 (1941). — Eichholtz, F.: Dtsch. med. J. **5**, 405 (1954). — Fisher, R. A.: Statistical methods for res. workers, London (1938). — Inoué, Sh.: Exper. Coll. Res. Suppl. **2**, 305 (1952). — Koller, S.: Graphische Tafeln, Steinkopf, Darmstadt (1953). — Lits, F. J.: Arch. Int. Med. **11**, 811 (1936). — Lits, F. J., A. Kirschbaum and L. C. Strong: Amer. J. Cancer **34**, 196 (1938). — Ludford, R. J.: Arch. exper. Zellforschg **18**, 411 (1936). — Peters, K.: Strahlenther. **95**, 283 (1954). — Peters, K.: Naturwissenschaften **42**, 376 (1955). — Peters, K., u. H. Lehr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 365 (1954). — Peters, K., H. Gärtner u. W. Krais: Strahlenther. 1955 (im Druck). — Ries, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **43**, 558 (1938). — v. Schelling, H.: Klin. Wschr. **1937**, 1691, **1938**, 1758. — Teir, H., and K. Ravanti: Exper. Coll. Res. **5**, 500 (1953).

Dr. K. Peters, Tübingen, Univ.-Frauenklinik.